

Entwicklung und Charakterisierung von organotypischen Cornea-
Konstrukten mit unterschiedlichen Epithelien für
In-vitro-Permeations- und Zytotoxizitätsuntersuchungen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Stefanie Döhring
aus Itzehoe

1. Referentin: Professor Dr. Christel C. Müller-Goymann

2. Referent: Professor Dr. Manfred Kietzmann

eingereicht am: 17.12.2008

mündliche Prüfung (Disputation) am: 09.04.2009

Druckjahr 2009

Für meine Eltern

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Reichl S, Döhring S, Bednarz J, Müller-Goymann CC (2005) Human cornea construct HCC - an alternative for in vitro permeation studies? A comparison with human donor corneas; Eur. J. Pharm. Biopharm. 60:305–308

Tagungsbeiträge

Döhring S, Reichl S, Müller-Goymann CC (2004) Comparison of the *in vitro* permeation of different ophthalmic drugs through a human cornea construct (HCC) and human donor corneas (Poster), International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Nürnberg

Döhring S, Reichl S, Müller-Goymann CC (2005) Eignung humaner organotypischer Permeationsmodelle für Zytotoxizitätsuntersuchungen (Poster), 9. GD-Jahrestagung, Wien

Döhring S, Reichl S, Müller-Goymann CC (2006) Qualification of human permeation models for cytotoxicity assays – A comparison of traditional monolayer studies with human cornea constructs (HCC) (Poster), 5th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Genf

Döhring S, Reichl S, Müller-Goymann CC (2006) 3D human cornea-constructs for cytotoxicity studies (Vortrag), 10th Congress of the International Society of Ocular Toxicology, Bonn-Königswinter

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Frau Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann

danke ich herzlich für die Zuweisung des Themas, die Unterstützung bei dessen Bearbeitung sowie für die ständige Diskussionsbereitschaft und die persönliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. M. Kietzmann danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Ich möchte mich bei allen technischen und wissenschaftlichen Mitarbeitern des Institutes für die besonders freundliche Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit sowie für hilfreiche Unterstützung und fachliche Diskussionen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, bedanken.

Besonders möchte ich mich bei Frau Dagmar Hahne, Frau Britta Meier, Frau Ulrike Kruse und Frau Lucia Albrecht für ihre tolle Unterstützung und ihren Einsatz im Zellkulturlabor bedanken. Herrn Dr. Stephan Reichl und Frau Dr. Christine Hoffmann danke ich für die Einführung in die Zellkultur und die anregenden fachlichen Diskussionen. Herrn Christian Weber möchte ich für die Unterstützung bei den HPLC-Messungen danken.

Weiterhin danke ich:

den Hornhautbanken der Medizinischen Hochschule Hannover und des Uniklinikums Eppendorf Hamburg für die Unterstützung mit humanen scleralen Ringen und Spenderhornhäuten

Herrn Dr. Jürgen Bednarz, Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde des Uniklinikums Eppendorf Hamburg, für die Überlassung der humanen cornealen Endothelzelllinie der Firma Nestec, insbesondere Frau Dr. Elizabeth Offord-Carvin vom Nestle Research Center in Lausanne, für die zur Verfügungstellung der CEPI 17 CL 4 Zelllinie

Danksagung

Zum Abschluss danke ich Herrn Andreas Melhorn für die tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Allgemeiner Teil	3
2.1	Das Auge	3
2.1.1	Die äußere Augenhaut	3
2.1.2	Die mittlere Augenhaut	4
2.1.3	Die innere Augenhaut	4
2.1.4	Die vordere und hintere Kammer	5
2.2	Die Cornea	5
2.2.1	Das Epithel	7
2.2.2	Die Bowman-Membran	7
2.2.3	Das Stroma	8
2.2.4	Die Descemet-Membran	8
2.2.5	Das Endothel	9
2.3	Ausgewählte Erkrankungen des Auges und ihre Therapie	9
2.3.1	Das Glaukom	10
2.3.2	Entzündliche Erkrankungen des Auges	13
2.4	Zellkulturen	16
2.4.1	Corneale Zellkulturen	18
2.4.2	Organotypische Zellkulturmodelle und deren Verwendung	21
2.5	Corneale Absorption von Arzneistoffen	24
2.6	Tierversuche und Zellkultursysteme als Alternativmethoden	27
2.6.1	Draize-Test	29
2.6.2	Alternative Zytotoxizitätsuntersuchungen	31
3	Material und Methoden	34
3.1	Material	34
3.1.1	Biologisches Material	34
3.1.2	Arzneistoffe	34
3.2	Methoden	35
3.2.1	Zellkulturen	35
3.2.2	Aufbau des Cornea-Konstrukts	39

3.2.3	Histologische Untersuchungen.....	42
3.2.4	Permeationsuntersuchungen	43
3.2.5	HPLC-Bestimmung der Arzneistoffe	44
3.2.6	Physikalische Bestimmungen.....	45
3.2.7	Zytotoxizitätsuntersuchungen.....	46
3.2.8	Statistische Auswertung der Messdaten	52
4	Versuchsergebnisse und Diskussion.....	53
4.1	Kultivierung und Charakterisierung der humanen cornealen Zellen... 53	
4.1.1	Kultivierung der cornealen Zelllinien	53
4.1.2	Wachstumsverhalten der cornealen Zellen	57
4.1.3	Zusammenfassende Diskussion zur Kultivierung und Charakterisierung der humanen cornealen Zelllinien	61
4.2	Aufbau des humanen Cornea-Konstrukts	62
4.2.1	Humanes Cornea-Konstrukt aus Endothelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen der Zelllinie CEPI	62
4.2.2	Humanes Cornea-Konstrukt aus Endothelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen der Zelllinie HCE-T	65
4.2.3	Zusammenfassende Diskussion zum Aufbau der Cornea-Konstrukte	66
4.3	Permeationsuntersuchungen.....	68
4.3.1	Vergleichende Permeationsuntersuchungen durch humane Cornea-Konstrukte mit CEPI-Epithel und humane Spenderhornhaut.....	69
4.3.2	Permeationsuntersuchungen durch humane Cornea-Konstrukte mit HCE-T-Epithel	74
4.4	Zytotoxizitätsuntersuchungen an Zellmonolayern.....	81
4.4.1	Morphologische Veränderung der Zellen durch Einwirkung von zytotoxischen Substanzen.....	82
4.4.2	Vergleichende Untersuchungen zum zytotoxischen Potential ausgewählter Substanzen an den verschiedenen Zelllinien mittels MTT-Test.....	85
4.4.3	Vergleichende Zytotoxizitätsuntersuchung von SDS am Zellmonolayer mittels Neutralrot-Test	95
4.4.4	Zusammenfassende Diskussion zu den vergleichenden Untersuchungen zum zytotoxischen Potential ausgewählter Substanzen an den verschiedenen Zelllinien	97

4.5	Zytotoxizitätsuntersuchungen am organotypischen humanen Cornea-Konstrukt	100
4.5.1	Morphologische Veränderung der Cornea-Konstrukte durch Einwirkung von zytotoxischen Substanzen	100
4.5.2	Vergleichende Untersuchungen zum zytotoxischen Potential ausgewählter Substanzen an den Cornea-Konstrukten mittels MTT-Test	103
4.5.3	Vergleichende Zytotoxizitätsuntersuchungen an Cornea-Konstrukten mittels Neutralrot-Test	111
4.5.4	Zusammenfassende Diskussion zu den vergleichenden Untersuchungen zum zytotoxischen Potential ausgewählter Substanzen an Cornea-Konstrukten	113
5	Abschlussdiskussion.....	116
5.1	Kultivierung und Charakterisierung der humanen cornealen Zellen.	116
5.2	Aufbau und Charakterisierung der humanen Cornea-Konstrukte mit zwei unterschiedlichen Epithelzelllinien.....	117
5.3	Vergleichende Permeationsuntersuchungen mit exzidiierter humaner Cornea und den Cornea-Konstrukten mit zwei unterschiedlichen Epithelzelllinien	118
5.4	Vergleichende Zytotoxizitätsuntersuchungen an den unterschiedlichen Cornea-Zellarten	120
5.5	Vergleichende Zytotoxizitätsuntersuchungen an den beiden Cornea-Konstrukt-Typen	123
6	Zusammenfassung.....	127
7	Literaturverzeichnis	130

1 Einleitung

Untersuchungen zur Arzneistoffabsorption und -verträglichkeit sind in der Entwicklung neuer ophthalmologischer Wirkstoffe und ihrer Arzneiformen zur Anwendung am Auge unerlässlich. Diese Untersuchungen werden zum überwiegenden Teil an lebenden Tieren bzw. Tierorganen durchgeführt.

Tierversuche sind allerdings als problematisch anzusehen. Zum einen sind Untersuchungen an lebenden Tieren und deren Tötung für experimentelle Zwecke aus ethischer Sicht kritisch zu beurteilen [Sharpe, 1985], und die entsprechende Tierhaltung durch ihren hohen Personal- und Verwaltungsaufwand sehr kostenintensiv [Schleger et al., 2001]. Zum anderen ist es weiterhin umstritten, inwieweit an tierischen Organismen und mit tierischem Material gewonnene Daten auf die humanen Verhältnisse übertragbar sind [Spielmann, 1997].

Aus diesem Grund finden In-vitro-Untersuchungen an Zellkulturmodellen als Ersatz für Tierversuche zunehmendes Interesse. Die Untersuchungen am organotypischen Zellkulturmodell sind einfach im Labor durchzuführen, ethisch unbedenklich und die Ergebnisse sind besser reproduzierbar [Freshney, 1990]. Zusätzlich ist von Bedeutung, dass aufgrund der aktuellen gesetzlichen Vorgaben - wie dem Verbot von Tierversuchen bei der Sicherheitstestung von Kosmetika und der von der Verordnung zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH) geforderten Nachtestung von Altstoffen durch die chemische Industrie - ein immer größer werdender Bedarf an Alternativmethoden entsteht [Combes et al., 2004].

In einer früheren Arbeit wurde in diesem Institut ein organotypisches humanes Cornea-Konstrukt entwickelt, das aus der cornealen Endothelzelllinie HENC, in eine Kollagenmatrix eingebetteten nativen Fibroblasten und der Epithelzelllinie CEPI besteht und seitdem für Permeationsuntersuchungen genutzt wird [Reichl et al., 2004]. Grundgedanke der vorliegenden Arbeit ist es, ausgehend von diesem organotypischen humanen Cornea-Konstrukt ein Tierversuchersatzmodell zu entwickeln, welches sowohl für Permeations- als auch für Zytotoxizitätsuntersuchungen geeignet ist.

Durch vergleichende Untersuchungen zur Permeation von verschiedenen Wirkstoffen soll Aufschluss darüber gewonnen werden, inwieweit die Permeabilität des humanen Cornea-Konstrukts mit der Permeabilität exzidierter humaner

Spendercornea vergleichbar ist. Bei den Zytotoxizitätsuntersuchungen soll das komplex aufgebaute dreidimensionale Cornea-Konstrukt ein realistischeres Bild von der Schädigung einer Substanz aufzeigen, als es im isoliert kultivierten Monolayer der Fall ist.

Ziele der vorliegenden Arbeit sind deshalb:

- die Charakterisierung der unterschiedlichen humanen cornealen Zelltypen, insbesondere der neu eingesetzten Epithelzelllinie (HCE-T),
- die Kultivierung des organotypischen humanen Cornea-Konstrukts mit der Epithelzelllinie HCE-T und der Vergleich mit dem bisherigen Modell,
- ein Vergleich der Barriereigenschaften der organotypischen humanen Cornea-Konstrukte mit exzidiierter humaner Cornea anhand verschiedener Arzneistoffe,
- Zytotoxizitätsuntersuchungen der humanen cornealen Zellen am Monolayer und die Beurteilung des schädigenden Potentials der verwendeten Arzneistoffe,
- ein Vergleich der Zytotoxizitätsuntersuchungen am Monolayer mit Zytotoxizitätsuntersuchungen an den organotypischen humanen Cornea-Konstrukten.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Das Auge

Das Auge (Abbildung 1) ist ein lichtempfindliches Sinnesorgan, mit dem wir unsere Umwelt wahrnehmen können. Hornhaut und Linse sind die bildentwerfenden Abschnitte des Auges. Der bildaufnehmende Teil ist die Netzhaut, in dieser werden die Lichtreize (elektromagnetische Wellen von etwa 400-750 nm) über photochemische Prozesse in Erregungen umgewandelt, die über den Sehnerv in den visuellen Cortex im Hinterhauptslappen des Großhirns weitergeleitet werden [Thews et al., 1999].

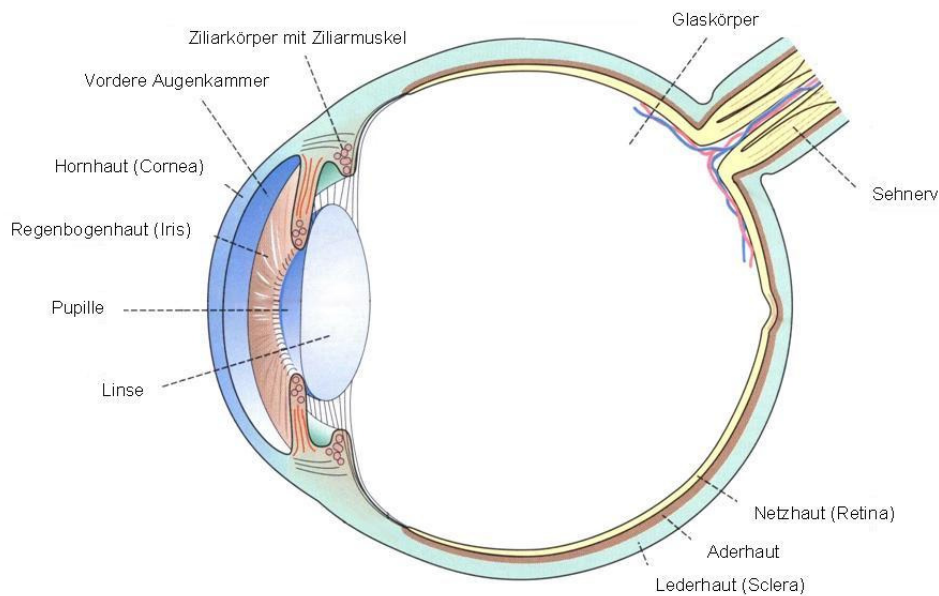


Abbildung 1: Querschnitt durch das menschliche Auge [nach Weitz, 1998]

2.1.1 Die äußere Augenhaut

Die äußere Augenhaut bildet eine kugelförmige Hülle festen Bindegewebes um den Augapfel. Sie setzt sich aus der durchsichtigen Hornhaut (Cornea), welche ungefähr das vordere Sechstel des Augapfels einnimmt, und der sehr derben, undurchsichtigen Lederhaut (Sclera) zusammen. Die Besonderheit der Cornea ist ihre Transparenz, obwohl sie wie auch die Sclera vorwiegend aus straffen, kollagenen Bindegewebsfasern besteht. Die Hornhautkrümmung hat einen etwas kürzeren Radius als der übrige Augapfel, so dass die Cornea wie ein Uhrglas geformt ist. Dadurch

entsteht am Übergang von der Sclera zur Cornea eine flache Rinne, die als Limbus-region bezeichnet wird. Die menschliche Cornea hat etwa einen Durchmesser von 11,5 mm [Leydhecker, 1990].

2.1.2 Die mittlere Augenhaut

Die mittlere Augenhaut, auch als Uvea bezeichnet, besteht aus der durchschnittlich 0,2 mm dicken Aderhaut, welche der Sclera innen angelagert ist, dem Ziliarkörper und der Regenbogenhaut (Iris), die ringförmig das Sehloch (Pupille) umgibt. Die Aderhaut enthält viele Gefäße, die zur Ernährung des Pigmentepithels und der Photorezeptoren der Netzhaut und der Temperaturkontrolle im hinteren Augenabschnitt dienen. Der Ziliarkörper enthält die glatten Muskelfasern des Ziliarmuskels, der den Krümmungsradius der Linse reguliert (Akkommodation). Außerdem wird hier das Kammerwasser gebildet.

Die Iris trennt die vordere Augenkammer von der kleineren, seitlich der Linse gelegenen, hinteren Augenkammer. Sie ist die Blende des Auges, da sie durch Veränderung der Pupillengröße den Lichteinfall reguliert. Die Linse befindet sich unmittelbar hinter der Pupille und der Iris, wobei sie rückseitig an den gallertartigen Glaskörper grenzt [Thews et al., 1999].

2.1.3 Die innere Augenhaut

Die innere Augenhaut besteht aus der Netzhaut (Retina), welche aus zwei Blättern besteht, dem Pigmentepithel und dem lichtempfindlichen Teil. Die Epithelzellen erscheinen aufgrund der enthaltenen Melanosomen schwarz und schützen das Augeninnere vor störenden Reflexerscheinungen. Ihre Hauptfunktion ist die Ernährung der Sensorzellen [Thews et al., 1999]. Im lichtempfindlichen Teil liegen die eigentlichen Sinneszellen der Retina, die in der Lage sind, auftreffendes Licht in ein elektrisches Signal umzuwandeln, das dann durch Nervenzellen weitergeleitet wird. Die Netzhaut mit ihren lichtempfindlichen Rezeptoren und nachgeschalteten Nervenzellen ist maßgeblich am Sehvorgang beteiligt [Speckmann und Wittkowski, 2004].

2.1.4 Die vordere und hintere Kammer

Getrennt von der Iris liegen im vorderen Augenabschnitt die vordere und hintere Kammer. Sie sind gefüllt mit dem Kammerwasser, das durch aktive Sekretion des Ziliarepithels in der hinteren Augenkammer gebildet wird [Beck und Langhage, 1995]. In der vorderen Kammer, in der die Hornhautrückfläche zur Iris umbiegt, befindet sich der funktionell wichtige Kammerwinkel. Diese Umschlagsstelle wird vom Trabekelmaschenwerk gebildet. Den Kammerwinkel entlang zieht sich in tieferen Schichten hinter dem Trabekelwerk der Schlemmsche Kanal (Abbildung 2), durch den das Kammerwasser in die sich anschließenden Venen abfließen kann [Leydhecker, 1990].

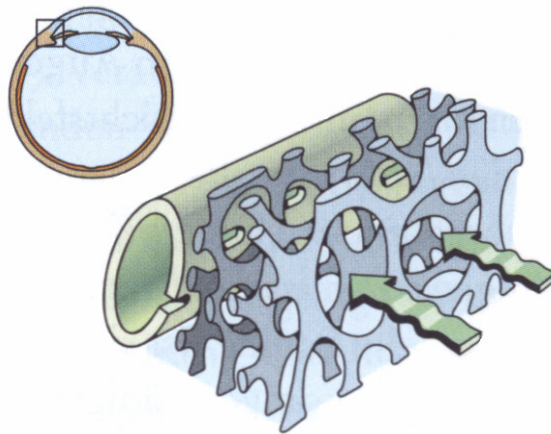


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Kammerwasserstroms durch das Trabekelwerk in den Schlemmschen Kanal [Flammer, 2001]

2.2 Die Cornea

Die Cornea ist der vordere durchsichtige Teil der äußeren Augenhaut und trennt die vordere Augenkammer mit ihrem Kammerwasser von der Luftumgebung. Sie hat somit eine ausgeprägte Schutzfunktion zu erfüllen.

Die Durchsichtigkeit ihres Gewebes ermöglicht den Sehvorgang und wird in erster Linie durch den richtigen Hydratationsgrad des Hornhautstromas, die besondere Anordnung der kollagenen Fasern und letztendlich auch durch das Fehlen von Gefäßen gewährleistet. Ernährt wird die Hornhaut durch Diffusion aus dem Kammerwasser, von der Tränenflüssigkeit und von arteriellen Gefäßen am Hornhautrand [Thews et al., 1999]. Die humane Hornhaut stellt eine sphärisch gewölbte, elliptische Linse dar, deren Krümmungsradius 7-8 mm und deren Brechkraft ca. 42-45 dptr beträgt [Kühnel und Mendoza, 1987]. Der horizontale Durchmesser ist mit

11,6-11,9 mm im Allgemeinen 1 mm größer als der vertikale Durchmesser mit 10,6-11,0 mm. Die Hornhautdicke in vivo beträgt ca. 0,5 mm im Hornhautzentrum und 0,7 mm in der Peripherie [Leydhecker, 1990; Kunsch und Kunsch, 2005; Junqueira, 1991]. Durch diesen Dickenunterschied resultiert eine gegenüber der Außenseite stärkere Krümmung der Innenseite (konvex-konkave Form).

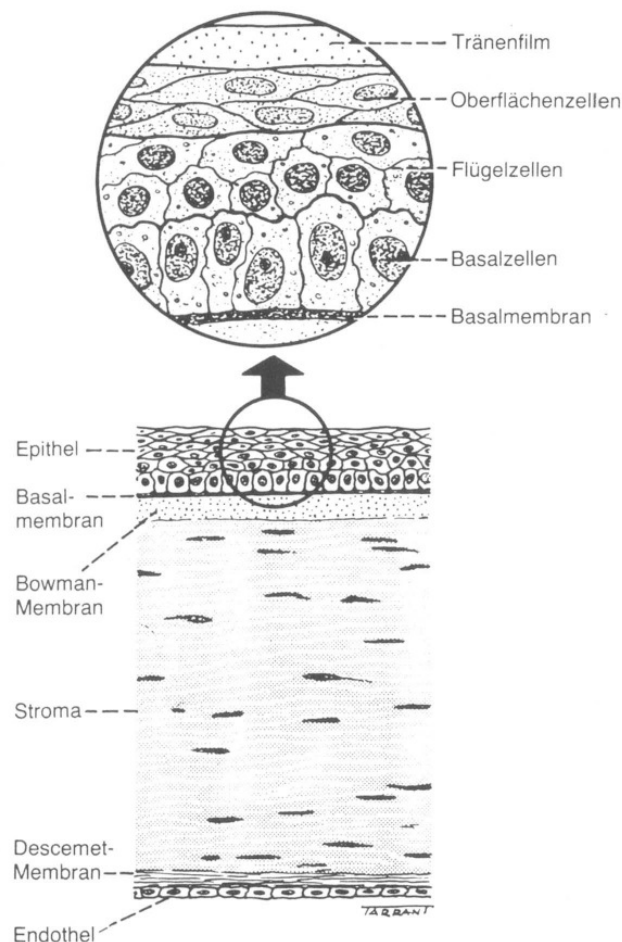


Abbildung 3: Anatomie der Hornhaut [Kanski und Spitznas, 1987]

Der Aufbau der humanen Cornea ist fünfschichtig (Abbildung 3). Die äußerste Schicht wird von mehreren Lagen Epithelzellen gebildet, wobei die Basalzellen die unterste Lage bilden und der Bowman-Membran aufsitzen. Die mittlere Schicht wird als Stroma bezeichnet. Zwischen dem Stroma und dem abschließenden einschichtigen Endothel befindet sich die Descemet-Membran.

2.2.1 Das Epithel

Das corneale Epithelgewebe ist ein mehrschichtiges, nicht verhornendes Plattenepithel mit einer Dicke von ungefähr 50 µm, das entspricht ca. 10 % der gesamten Hornhautdicke. Die 5-6 Zellschichten, die das Epithel besitzt, werden in 3 Zelltypen unterteilt: die Basalzellen, die Flügelzellen und die Oberflächenzellen. Die durchschnittliche Lebensdauer einer Epithelzelle von der Zellteilung bis zum Abschilfern der Oberflächenzellen beträgt 7-14 Tage.

Die pallisadenartigen Basalzellen, welche die unterste Zellschicht des Epithels bilden, sind durch Hemidesmosomen an der Basalmembran verankert, wodurch ein Schutz gegen mechanische Beanspruchung besteht. Nur diese Basalzellen sind mitotisch aktiv, wodurch das Epithel über regenerative Eigenschaften verfügt, so dass bei einer Verletzung Lücken rasch geschlossen werden [Junqueira, 1991]. Aus den Basalzellen entstehen durch Differenzierung die Flügel- und Oberflächenzellen.

Die polygonalen Flügelzellen sind in 2-3 Zellschichten angeordnet und überspannen die Basalzellen schirmartig. Ihren Namen haben die Flügelzellen wegen ihrer dünnen flügel- bzw. stachelartigen Fortsätze [Kühnel und Mendoza, 1987]. Sie stellen das Zwischenstadium des Differenzierungsprozesses beim Corneaepithel dar.

Die Corneaoberfläche wird aus 2-4 Schichten von langen, extrem flachen und ausdifferenzierten Oberflächenzellen gebildet, die Falten und Zotten zur Vergrößerung der Epitheloberfläche tragen. Diese Fortsätze tauchen in den präcornealen Tränenfilm ein, der eine Schutzschicht darstellt und die optischen Eigenschaften verbessert [Junqueira, 1991]. Die Oberflächenzellen sind durch zahlreiche Desmosomen und enge Zellkontakte (tight junctions) miteinander verknüpft. Letztere bilden eine interzelluläre Permeationsbarriere für Substanzen.

2.2.2 Die Bowman-Membran

Die Bowman-Membran ist ein ca. 12 µm dickes azelluläres Band zwischen Epithel und Stroma. Sie besteht aus zufällig angeordneten Kollagenfasern des Typs I und III eingebettet in eine glykoproteinhaltige Grundsubstanz. Aufgrund der wahllosen Orientierung der Kollagenfibrillen lässt sie sich gut vom darunter liegenden Stroma unterscheiden. Da sie im biologischen Sinne keine Membran darstellt, wird sie auch Bowman-Schicht genannt. Nach einer Beschädigung kann sie sich nicht regenerieren [Kanski und Spitznas, 1987]. Die genaue biologische Funktion der Bowman-

Membran ist noch nicht vollständig geklärt. Obwohl einige Arbeitsgruppen vermuten, dass sie der Strukturhaltung des Epithels dient oder als Barriere gegen eindringende Viren fungiert, erscheint es immer wahrscheinlicher, dass die Bowman-Membran keine besondere Funktion besitzt [Wilson und Hong, 2000].

2.2.3 Das Stroma

Das Stroma ist mit 400-500 µm die dickste aller Hornhautschichten (90 % der Gesamtdicke). Das Hornhautstroma besteht aus 75 % Wasser, extrazellulärer Matrix sowie Zellen, die als Fibroblasten oder Keratozyten bezeichnet werden, und ist in seiner Gesamtheit als Bindegewebe anzusehen.

Zelluläre Komponenten machen nur ca. 2-3 % des Stromas aus, der Rest wird von verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix, welche von den Fibroblasten synthetisiert wird, ausgefüllt. Die Matrix besteht aus sauren Keratoglykosaminoglykanen und gestreckten Kollagenfibrillen, welche der Cornea Formbeständigkeit und Festigkeit verleihen. Die Kollagenfibrillen haben mit 10 % Kollagentyp III und 90 % Kollagentyp I ein für Bindegewebe typisches Kollagenmuster. Spuren von Kollagentyp V können ebenfalls enthalten sein [Radda und Menzel, 1983]. Das Stroma wird durch ungefähr 250-300 parallel zur Oberfläche verlaufende Lamellen gebildet, die jeweils um einen Winkel von 90° versetzt sind. Die Kollagenfibrillen in diesen Lamellen verlaufen parallel zueinander [Junqueira, 1991]. Diese extrem regelmäßige Anordnung der Kollagenfibrillen, die Abwesenheit von Gefäßen und der relativ niedrige und konstante Wassergehalt des Stromas begründen die Durchsichtigkeit der Hornhaut.

2.2.4 Die Descemet-Membran

Die Descemet-Membran wird häufig als Basalmembran des Endothels bezeichnet und stellt eine Spezialform basaler Membranen dar. Bei der Geburt etwa 3 µm dick nimmt sie im Laufe des Lebens an Dicke zu und erreicht im Erwachsenenalter ca. 8-10 µm. Der Zuwachs entsteht vermutlich durch Auflagerungen von Endothelkollagenen [Kanski und Spitznas, 1987]. Die Descemet-Membran erscheint lichtmikroskopisch homogen und besteht hauptsächlich aus Kollagenfasern des Typs IV und Laminin. Fibronectin ist ebenfalls Bestandteil der Descemet-Membran [Suda et al.,

1981]. Als Schutzschicht für das Endothel ist die Descemet-Membran besonders widerstandsfähig gegenüber Infektionen, mechanischen und chemischen Verletzungen sowie enzymatischer Zerstörung [Leydhecker, 1990]. Verletzungen heilen allerdings nur unter Narbenbildung aus, da die Descemet-Membran wie die Bowman-Membran nicht in der Lage ist sich zu regenerieren.

2.2.5 Das Endothel

Das Hornhautendothel bildet als innerste Schicht die Oberflächenbedeckung der Cornea gegen die vordere Augenkammer. Es besteht aus einer einschichtigen Lage hexagonaler Zellen, mit mosaikartiger Struktur und ist etwa 5 µm dick. Die Zelldichte beträgt in jungen Jahren ca. 3.500 Zellen/mm², nimmt aber mit zunehmendem Alter ab, da sich Endothelzellen nicht regenerieren können. Die benachbarten Zellen dehnen sich bei Defekten aus, um die entstandenen Lücken wieder zu schließen.

Die Funktionen des Endothels sind Regulation des Wassergehaltes im Stroma über aktive Ionenpumpen und Schutz vor eindringenden Substanzen aus dem Kammerwasser in die Cornea. Es reguliert den Stoffaustausch zwischen Stroma und Kammerwasser und regelt so die Versorgung der Cornea mit Nährstoffen wie Glucose oder Aminosäuren. Gleichzeitig erfolgt der Abtransport von Stoffwechselendprodukten wie dem Lactat. Durch diese Mechanismen stellt das Endothel die richtige Dicke und Durchsichtigkeit der Cornea sicher [Kanski und Spitznas, 1987]. Aufgrund ihrer Funktion als Permeationsbarriere für Substanzen aus dem Kammerwasser in die Cornea hat das Endothel einen eher lipophilen Charakter. Gleichzeitig weisen die Endothelzellen zahlreiche Zellverbindungen (tight junctions) auf [Svedberg und Bill, 1972]. Die Barrierefunktion ist jedoch infolge der geringeren Schichtdicke deutlich schwächer ausgeprägt als die des Epithels.

2.3 Ausgewählte Erkrankungen des Auges und ihre Therapie

Die untersuchten Modellarzneistoffe Timololhydrogenmaleat, Diclofenac-Natrium und Clindamycinhydrochlorid werden bei Erkrankungen eingesetzt, die im Folgenden erläutert werden.

2.3.1 Das Glaukom

Laut Definition ist das Glaukom eine Erkrankung des Sehnervs, bei der es zum kontinuierlichen Untergang von Nervenfasern kommt. Meistens wird die Krankheit jedoch an einem ihrer Hauptrisikofaktoren festgemacht, dem erhöhten Augeninnendruck (okuläre Hypertension). Dieser allein muss allerdings noch kein Glaukom auslösen [Grehn, 2001]. Meist kommen noch weitere Risikofaktoren wie Kurzsichtigkeit, starke Weitsichtigkeit, familiäre Veranlagung oder Diabetes hinzu [Flammer, 2001]. Die Erfolge einer prophylaktischen Behandlung des erhöhten Augeninnendrucks beim Patienten ohne Glaukomschaden sind noch kaum belegt. Nur wenn der Druck deutlich erhöht ist oder die oben genannten Risikofaktoren dazukommen, ist eine Augeninnendrucksenkung sinnvoll. Bei Schädigung des Sehnervs ist die Drucksenkung sehr wichtig, wobei der Augeninnendruck möglichst stabil auf tiefe Werte gesenkt werden sollte [Flammer, 2001].

Bei der Entstehung eines Glaukomschadens spielt neben dem erhöhten Augeninnendruck als Hauptrisikofaktor auch eine gestörte Netzhautdurchblutung eine Rolle [von der Eltz, 2000].

Das Glaukom ist nach Diabetes mellitus die zweithäufigste Erblindungsursache auf der Welt. Die Erkrankung bleibt häufig lange unentdeckt, da die glaukomatöse Schädigung gerade in den frühen Stadien symptomlos bleibt. Ohne Behandlung kommt es zum fortschreitenden Untergang von Sehnervfasern, der auch unter Behandlung nicht aufgehalten werden kann [Quigley, 1987]. Die Folge davon sind Gesichtsfeldausfälle sowie Störungen des Kontrast- und Farbensehens.

Bei den Glaukomen wird zwischen primären und sekundären Formen unterschieden.

2.3.1.1 Das primäre Glaukom

Primäre Glaukome machen mehr als 90 % der Glaukomerkrankungen aus [Niggemeier, 2005]. Bei den primären Formen werden das Normaldruckglaukom und das Hochdruckglaukom - letzteres unterteilt in Offenwinkelglaukom und Engwinkelglaukom - unterschieden.

Beim **Normaldruckglaukom** tritt eine fortschreitende Sehnervschädigung trotz überwiegend normaler Augeninnendruckwerte < 21 mm Hg auf. Durch verschiedene Faktoren wird die lokale Mikrozirkulation am Sehnervenkopf eingeschränkt, wodurch es zu einer Schädigung der Sehnervfasern kommt [Thews et al., 1999].

Beim **Hochdruckglaukom** ist der intraokulare Druck meist über Jahre hinweg erhöht. Wiederholt gemessene Drücke von 26 mm Hg oder mehr schädigen die Fasern des Sehnervs, und es kommt zu allmählichen Gesichtsfeldeinbußen.

Das häufigste Hochdruckglaukom ist das **Offenwinkelglaukom**, charakterisiert durch einen weit geöffneten Kammerwinkel. Es tritt gehäuft mit zunehmendem Alter auf [Wensor et al., 1998] und verläuft schleichend. Das Trabekelmaschenwerk verstopft allmählich, und es kommt so zu einem erhöhten Augeninnendruck [Becker et al., 1972] (Abbildung 4).

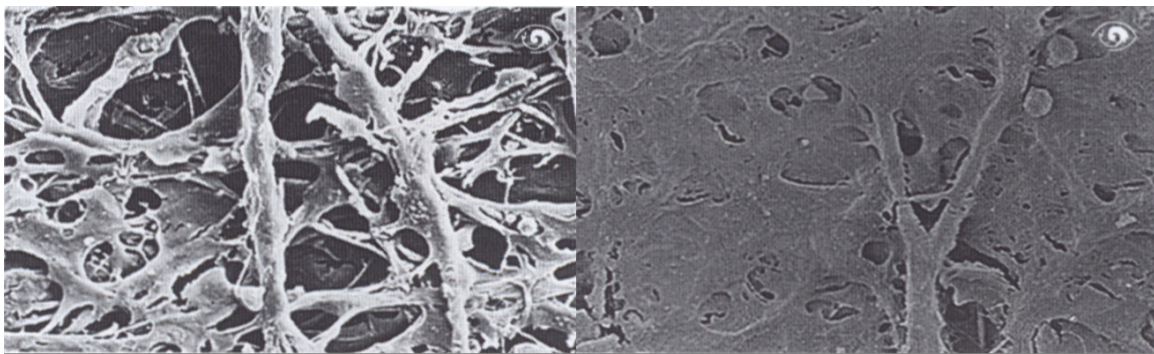


Abbildung 4: Trabekelwerk eines Gesunden (links) und eines Glaukompatienten (rechts) [Flammer, 2001]

Das **Engwinkelglaukom** ist eine Folge der Abflussbehinderung des Kammerwassers durch einen zu engen Kammerwinkel (Abbildung 5). Beim akuten Winkelblockglaukom sind die Abflusswege durch Anlagerung der Irisbasis an das Trabekelwerk vollständig verlegt [Göbel und Grehn, 1998], das kann zu intraokulären Drücken von bis zu 60-80 mm Hg führen. Beim chronischen Verlauf sind die Abflusswege nur teilweise verlegt. In diesem Fall kommt es zu deutlichen Druckschwankungen im Tagesverlauf und anfallsartigen Drucksteigerungen [Thews et al., 1999].

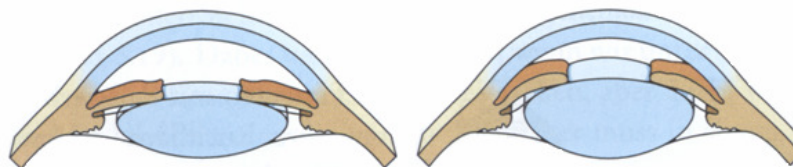


Abbildung 5: Normaler (links) und enger (rechts) Kammerwinkel [Flammer 2001]

2.3.1.2 Das sekundäre Glaukom

Beim sekundären Glaukom ist die intraokulare Druckerhöhung eine Folge von anderen Augen- oder Allgemeinerkrankungen. Die möglichen Ursachen dafür können sehr vielfältig sein. Nach Verletzungen können Narben in den Trabekeln zurückbleiben, und durch Verätzungen kann es zu einer Vernarbung des Schlemm-Kanals kommen. Des Weiteren kann als Folge von Entzündungen oder bei Gefäßneubildung auf der Iris das Trabekelwerk durch Eiweiß verstopft werden.

Ein Beispiel für ein sekundäres Glaukom als Folge unerwünschter Arzneimittelwirkungen ist die Drucksteigerung bei längerer Corticosteroidgabe [Tripathi et al., 1999]. Ziel der Behandlung des sekundären Glaukoms ist zuerst die Beseitigung der ursächlichen Erkrankung.

2.3.1.3 Arzneistoffe zur Therapie des Glaukoms

Bei der Therapie des Glaukoms steht die Senkung des Augeninnendrucks im Vordergrund. Grundsätzlich wird immer erst versucht, dies durch eine lokale medikamentöse Therapie zu erreichen. Zu unterscheiden sind momentan fünf verschiedene Substanzgruppen:

- Prostaglandine (z. B. Latanoprost, Travoprost, Bimatoprost)
- Betarezeptorenblocker (z. B. Timolol, Befunolol, Betaxolol, Carteolol, Metipranolol, Levobunolol)
- Carboanhydrasehemmstoffe (z. B. Brinzolamid, Dorzolamid)
- Alpha-Sympathomimetika (z. B. Dipivefrin, Brimonidin, Clonidin, Apraclonidin)
- Parasympathomimetika (z. B. Carbachol, Pilocarpin, Aceclidin)

Laut den Therapierichtlinien des Royal College of Ophthalmologists von 2004 sind die Prostaglandine und die Betarezeptorenblocker die Mittel der ersten Wahl bei primärem Offenwinkelglaukom, gefolgt von Carboanhydrasehemmstoffen und Alpha-Sympathomimetika als zweite Wahl [Hopkins und Pearson, 2007]. Reicht eine Monotherapie nicht aus, werden Kombinationen angewendet.

Der in dieser Arbeit verwendete Arzneistoff gehört der Gruppe der Betarezeptorenblocker an.

Betarezeptorenblocker (β -Blocker) wurden ursprünglich zur Therapie von kardiovaskulären Störungen entwickelt und werden noch heute hauptsächlich dafür verwendet. Seit der Entdeckung der augeninnendrucksenkenden Wirkung von Propranolol [Vale und Phillips, 1970] wurden viele weitere β -Blocker zur Therapie des Glaukoms getestet. Diese populärste Gruppe an Glaukommitteln wurde 1978 eingeführt und reduziert den Augeninnendruck durch Verminderung der Kammerwasserproduktion [Liu et al., 1980], wobei sie aber keine Änderung des Kammerwasserabflusses bewirkt [Sonntag et al., 1978]. Der genaue Wirkungsmechanismus der β -Blocker im Bezug auf die drucksenkende Wirkung wird kontrovers diskutiert und ist noch nicht abschließend geklärt [Fechner und Teichmann, 2000].

Die lokalen unerwünschten Arzneimittelwirkungen sind deutlich weniger ausgeprägt als bei den früher verwendeten Miotika. Am häufigsten tritt ein trockenes Auge mit Fremdkörpergefühl auf. Allerdings muss bei lokaler Gabe von β -Blockern mit systemischen Nebenwirkungen gerechnet werden [Bartlett et al., 1995]. Durch β_1 -Blockade kann es im kardiovaskulären Bereich zu Bradykardien und Blutdruckabfall und durch β_2 -Blockade im pulmonalen Bereich zu Bronchospasmen kommen, woraus sich für disponierte Glaukompatienten Vorsichtsmaßnahmen bzw. Kontraindikationen ergeben können. **Timolol** ist ein nicht selektiver Betarezeptorenblocker mit Wirkungen sowohl auf β_1 - als auch auf β_2 -Rezeptoren. Es ist in Form einer wässrigen Augentropfenlösung in den Konzentrationen 0,1 %, 0,25 % und 0,5 %, sowie als Hydrogel mit 0,1 % erhältlich und wird zu Beginn der Dauertherapie für gewöhnlich zweimal täglich angewendet (als Gel nur einmal täglich). Nach Einstellung eines konstanten Drucks genügt eine einmalige Applikation am Tag.

Gelingt die medikamentöse Drucksenkung nicht mehr, wird versucht mit einer Laserbehandlung den Kammerabfluss zu erleichtern und somit den Druck zu senken. Erst wenn diese Maßnahme erfolglos bleibt, ist die Operation indiziert.

2.3.2 Entzündliche Erkrankungen des Auges

Eine Entzündung ist die Antwort des menschlichen Körpers auf Reize, wie z. B. Mikroorganismen, chemische Substanzen oder Verbrennungen. Es handelt sich um eine komplexe Reaktion des Organismus unter Einbeziehung des Immunsystems.

Wie bei allen akuten Entzündungen kann man auch bei entzündlichen Erkrankungen des Auges die fünf klassischen Entzündungszeichen beobachten:

- Rötung (Rubor)
- Schwellung (Tumor)
- Hitze (Calor)
- Schmerz (Dolor)
- gestörte Funktion (Functio laesa)

Entzündungen haben die Funktion das schädigende Agens auszuschalten oder in seiner schädlichen Wirkung zu begrenzen, wie z. B. bei der Abwehrreaktion des Körpers gegen Mikroorganismen. Allerdings können Entzündungen auch exzessiv werden und so den initialen Schaden vergrößern und zu einer anhaltenden Schädigung des Gewebes führen [Thews et al., 1999]. Dies gilt insbesondere für das Auge, wo die empfindlichen, transparenten Strukturen sehr anfällig für Schäden durch Narbenbildung sind. Schwere Entzündungen im Auge können zu problematischen und bleibenden Augenschäden bis zur Erblindung führen. Die betroffenen Regionen können dabei unterschiedlich sein. Man unterscheidet z. B. Entzündungen an den Lidern (Gerstenkorn, Blepharitis), an der Bindehaut (Konjunktivitis), an der Cornea (Keratitis), an der Iris (Iritis, Iridozyklitis), an der Aderhaut (Uveitis), an der Netzhaut (Retinitis), an der Sclera (Scleritis) oder auch am Sehnerv (Neuritis nervi optici) [Leydhecker, 1990].

Eine Entzündung ist ein komplexer Vorgang, der unter Beteiligung vieler endogener Substanzen (Entzündungsmediatoren), immunkompetenter Zellen und gestörter Mikrozirkulation die oben angeführten Entzündungssymptome auslöst. Es kommt zu einer gesteigerten Produktion von Prostaglandinen und Leukotrienen aus Arachidonsäure mittels einer Cyclooxygenase und einer Peroxidase. Diese sorgen für eine Schmerzsensibilisierung und eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität im betroffenen Bereich [Thews et al., 1999]. Die Freisetzung von Histamin aus Mastzellen verstärkt diese Effekte und führt zusätzlich zu einer Vasodilatation. Im Auge können diese Gefäßreaktionen zu einer Rötung und zu einem Anstieg der Proteinkonzentration im Kammerwasser führen, wodurch der Abfluss behindert sein und ein sekundäres Glaukom entstehen kann (s. Abschnitt 2.3.1.2). In die betroffene Region wandern verstärkt Leukozyten durch die Gefäßwände, um den Entzündungsauslöser und die

geschädigten Zellen mittels Phagozytose zu beseitigen. Ein weiterer Teil der Entzündungsreaktion ist der Wundheilungsmechanismus, der zum Wiederaufbau des geschädigten Gewebes führt. Die Bildung von Bindegewebe und Kollagenfasern kann zu Narbenbildung und im Falle der Hornhaut zu einer Trübung führen [Hopkins und Pearson, 2007]. Wegen solcher Folgeschäden einer Entzündung am Auge ist es nötig, die Ausbreitung durch geeignete Medikamente zu verhindern.

2.3.2.1 Arzneistoffe zur Therapie von entzündliche Erkrankungen des Auges

Man kann zum einen die Ursache behandeln, z. B. durch Antibiotikagabe bei bakteriellen Infektionen und zum anderen die Entzündungsreaktion unterdrücken.

Als Beispiel für ein Antibiotikum wurde in dieser Arbeit das Clindamycinhydrochlorid eingesetzt. **Clindamycin** ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Lincosamide. Es bindet wie Erythromycin und Chloramphenicol an die 50S Untereinheit der Ribosomen und hemmt die Proteinsynthese. Sein Wirkspektrum umfasst Streptokokken, Staphylokokken und Anaerobier. Clindamycin wird üblicherweise systemisch bei Anaerobierinfektionen eingesetzt. Es wird diskutiert, ob Clindamycin zur Behandlung der Toxoplasmose des Auges geeignet ist [Lakhanpal et al., 1983]. Diese Infektion des Auges zeigt meist starke Entzündungssymptome und scharf begrenzte Nekrosen der Netzhaut. Die Erreger (*Toxoplasma gondii*) bilden intrazelluläre Gewebezysten, vorwiegend im neuronalen Gewebe des Gehirns, im quergestreiften Muskel und in der Netzhaut des Auges [Pleyer et al., 2007]. Letzteres kann zu wiederkehrenden, nekrotisierenden Läsionen der Netz- oder Aderhaut führen.

Zur Unterdrückung der Entzündungsreaktion werden Antiphlogistika oder Antihistaminika meist lokal, bei schweren Entzündungen auch systemisch eingesetzt. Man unterteilt die Antiphlogistika grob in Glucocorticoide (z. B. Hydrocortison, Prednisolon, Triamcinolon, Dexamethason, Fluorometholon, Rimexolon) und in nichtsteroidale Antiphlogistika (z. B. Diclofenac, Ketorolac, Indometacin, Flurbiprofen). Letztere wurden als Alternative zu den Glucocorticoiden entwickelt, die zwar sehr effektiv die Entzündungssymptome beheben, aber zu schwerwiegenden lokalen und systemischen Nebenwirkungen führen können. Beispiel hierfür ist das sekundäre Glaukom nach längerer Corticosteroidgabe (s. Abschnitt 2.3.1.2). Die nichtsteroidalen Antiphlogistika wirken alle analgetisch, antipyretisch und entzündungshemmend. Die antiphlogistische Wirkung des **Diclofenac-Natriums** beruht auf einer Hemmung der Prostaglandinsynthese durch Angriff an der Cyclooxygenase.

Es wird zur Aufrechterhaltung der Mydriasis bei operativen Eingriffen [Erturk et al., 1991], zur Linderung postoperativer Entzündungssymptome und zur Prophylaxe von Veränderungen am Augenhintergrund (zystoides Makulaödem) nach Katarakt-Operationen eingesetzt, außerdem bei allen nicht infektiösen Entzündungen des Auges zur entzündungshemmenden, abschwellenden und analgetischen Behandlung. Diclofenac-Natrium wird in Konzentrationen von 0,1 % verwendet. Die Augentropfen werden in der Regel gut vertragen, es kann allerdings zu leichtem Augenbrennen und gelegentlichem verschwommenen Sehen kommen. Die Dosierung ist je nach Schwere der Symptome 3-5mal täglich 1 Tropfen, bei operativen Eingriffen 3-5 Tropfen innerhalb von 1-2 Stunden vor der Operation.

2.4 Zellkulturen

Die Anfänge der Gewebekultur lassen sich bis in das frühe 20. Jahrhundert zurückverfolgen [Harrison, 1907; Carrel, 1912]. Diese Methode, die sowohl Organkultur als auch Zellkultur umfasst, sollte es ermöglichen das Verhalten von Zellen unabhängig vom restlichen Organismus zu studieren. Nachdem es durch die Entdeckung von Antibiotika und der damit verbundenen Eindämmung von Kontaminationen mit Mikroorganismen sowie der Entwicklung definierter Nährmedien durch Ringer und Earle um 1943 zu einem Aufschwung der Zellkultur kam, ist sie seit den sechziger Jahren ein wichtiger Bestandteil naturwissenschaftlicher Forschung und Praxis [Freshney, 2005]. So werden Zellkulturen heute nicht nur zur Grundlagenforschung von zellulären Prozessen genutzt, wie z. B. die Erforschung der Zellgenetik, das Studium zellulärer Wechselwirkungen oder intrazellulärer Kontrollmechanismen der Zelldifferenzierung und Entwicklung [Auerbach und Grobstein, 1958; Bednarz et al., 1995], sondern auch zur Produktion biotechnischer Produkte wie antiviraler Impfstoffe oder zur Entwicklung monoklonaler Antikörper mittels der Hybridomatechnik eingesetzt [Köhler und Milstein, 1975]. Weiterhin werden kultivierte Zellen als Testsysteme verwendet, beispielsweise bei der Untersuchung der Wirkung von Substanzen auf die Signaltransduktion und Toxizität der Zelle oder als einfache Permeationsmodelle [Audus et al., 1990; Gay et al., 1992; Schneider, 1996; Specht et al., 1998; Tegtmeyer et al., 2001; Reichl und Müller-Goymann, 2001].

Diese In-vitro-Systeme haben viele Vorteile gegenüber den konventionellen Methoden. Mit ihrer Hilfe kann man schnell Aussagen über Permeabilität und Metabolismus von Wirkstoffen treffen. Man hat daneben die Möglichkeit die molekularen

Mechanismen des Stofftransports und die Aktivierung beziehungsweise Inaktivierung von Wirkstoffen zu erforschen. Es lassen sich Strategien für zielgerichtetes Drug Targeting, verbesserten Wirkstofftransport und verringerten Metabolismus entwickeln. Außerdem hat man die Möglichkeit alle Untersuchungen mit humanem Zellmaterial durchzuführen und kann die zeitaufwendigen, teuren und ethisch umstrittenen Tierversuche auf ein Minimum reduzieren [Audus et al., 1990].

Die meisten nativen Zellen - mit Ausnahme einiger Tumorzelllinien - haben in Kultur eine eher begrenzte Lebensdauer von 20 bis 100 Generationen mit zum Ende hin rasch eintretendem Alterungsprozess und stark verminderter Wachstumsrate [Freshney, 1990]. Um dieser Problematik zu entgehen, wurde versucht Zellen zu immortalisieren und sie so in kontinuierliche stabile Zelllinien umzuwandeln. Beispiele für die Erzeugung immortalisierter Zellen sind Einwirkung mutagener Agenzien, Strahlung und das Einschleusen von Fremd-DNA in die Wirtszelle mittels Transformation oder Transfektion [Schmitz, 2007]. Bei der Transformation der Zelle mit Viren handelt es sich um die Einschleusung von viraler Fremd-DNA in die Wirtszelle, wobei diese entweder in das Wirtszellgenom eingebaut oder aber autonom repliziert wird. Die Einschleusung erfolgt unter anderem mittels Infektion mit SV 40 Viren oder Behandlung der Zellen mit dem entsprechenden SV 40 large-T Antigen. Die onkogenen SV 40 Viren induzieren effizient eine Immortalisierung und haben im Gegensatz zu anderen Substanzen wie krebserzeugenden Verbindungen oder anderen Viren keine zytotoxischen Wirkungen [Freshney und Freshney, 1996]. Das zweite Verfahren, die Transfektion, beruht auf dem Gentransfer fremder DNA in die Wirtszelle ohne virale Transportvehikel, sondern z. B. mit Elektroporation, Calciumphosphat-Transfektion oder Lipofektion [Schmitz, 2007; Digweed et al., 1997].

Durch die Immortalisierung haben die Zellen in Kultur eine fast unbegrenzte Lebensdauer und zeigen oft eine verstärkte Wachstumsrate verbunden mit einer höheren Sättigungsdichte. Der Nachteil der transformierten Zellen ist der im Vergleich zu Normalzellen manchmal verringerte oder veränderte Differenzierungsstatus von Zellen mit speziellen Eigenschaften [Freshney, 2005].

In den vergangenen Jahren wurde ausgehend von Zellkulturen verschiedenster Herkunft und Differenzierung versucht, organotypische Äquivalente unterschiedlicher Gewebe zu entwickeln und diese für eine Reihe von Untersuchungen zu etablieren.

2.4.1 Corneale Zellkulturen

Schon zu Beginn der Zellkultur beschrieb Nagano (1914) eine frühe Methode zur Isolierung und Kultivierung von cornealen Endothelzellen. Es folgte in den späten fünfziger Jahren eine Reihe von Entwicklungen zur Isolierung und Kultivierung von cornealen Zelltypen in vitro. Zum einen wurde die Explantattechnik weiter genutzt, bei der die Zellen aus einem Stück Gewebe in das Kulturmedium auswachsen [Stocker et al., 1958; Adachi und Pollak, 1966], zum anderen wurden enzymatische Isolierungsmethoden entwickelt [Slick et al., 1965; Mannagh und Irvine, 1965], bei denen die Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Adhäsionen mit Hilfe von Proteasen aufgebrochen werden. Außerdem wurden noch mechanische Aufbereitungstechniken eingesetzt, wie das Abschaben von Zellen mit einem Skalpell [Pistsov et al., 1988; Chalabi, 1996].

2.4.1.1 Corneale Endothelzellen

Die cornealen Endothelzellen der meisten Spezies sind z. B. nach einer Verletzung nicht in der Lage sich zu regenerieren. Sie sind in vivo nicht mitotisch aktiv, und die Heilung von Zellverlusten erfolgt durch Größenwachstum, nicht durch eine Zunahme der Zellzahl. Beim Kaninchen ist das anders. Binder und Binder (1957) konnten zeigen, dass sich das Kaninchenendothel regeneriert. Von Sallmann et al. (1961) und Oh (1963) konnten ebenfalls die mitotische Aktivität des Kaninchenendothels zeigen. Aus diesem Grund wurden für viele Studien die cornealen Zellen von Kaninchen genutzt. Die Isolierung und Kultivierung von endothelialen Corneazellen des Kaninchens wurde erstmals von Matsui (1929) beschrieben. Stocker et al. (1958) gelang es die einzelnen Schichten der Kaninchencornea zu separieren und anschließend alle drei cornealen Zelltypen einzeln zu kultivieren.

Die erste Isolierung von humanen cornealen Endothelzellen gelang Mannagh und Irvine (1965) durch den Einsatz von Pronase als proteolytisches Enzym. Die Arbeitsgruppe um Engelmann untersuchte umfassend die Isolierung, Kultivierung, Charakterisierung sowie Transplantation humaner cornealer Endothelzellen [Engelmann et al., 1988, 1999a, b, 2001; Engelmann und Friedl, 1989, 1995; Böhnke et al., 1999; Bednarz et al., 2001]. In der Folge gelang Bednarz et al. (2000) die Immortalisierung humaner Endothelzellen, was zu einer vielfach erhöhten Lebensdauer der Zellen in Kultur führte und mehr Untersuchungen mit dem humanen Zellmaterial ermöglichte.

Zur Subkultivierung der Endothelzellen werden oft Wachstumsmedien mit einem Serumzusatz in Konzentrationen von 5 bis 20 % eingesetzt. Solch ein Zusatz hat allerdings den Nachteil, dass die Zusammensetzung des Mediums nicht mehr genau definierbar ist und so eine Standardisierung der Zellkultivierung nicht möglich ist. Bednarz et al. (2001) konnten auch die serumfreie Kultivierung humaner Endothelzellen zeigen.

2.4.1.2 Corneale Epithelzellen

Ein großes Problem bei der Gewinnung und Kultivierung von cornealen Epithelzellen wurde von Thygeson (1939) beschrieben. Er beobachtete ein Überwachsen der Epithelzellkulturen mit stromalen Zellen (Fibroblasten) bei Verwendung der Explantattechnik (s. Abschnitt 2.4.1), wobei die Fibroblasten später auswuchsen als die Epithelzellen. Lösungsansätze für diese Problematik waren die Entfernung der Explantate vor dem Auswuchs stromaler Zellen [Fowle und Ormsby, 1955], das mechanische Abkratzen des Epithels von der Kaninchencornea [Stocker et al., 1958] und das Abschneiden des Epithels vom Stroma [Smith et al., 1963].

Für die Isolierung von Epithelzellen wurden neben der Explantattechnik auch verschiedenste enzymatische Isolierungsmethoden entwickelt. Ein häufig benutztes Enzym war dabei Dispase II [Gipson und Grill, 1982; Forbes et al., 1984], andere Gruppen nutzten Collagenase [Chan und Haschke, 1982].

Vergleichende Untersuchungen der Wachstumscharakteristik von Epithelzellen aus peripheren und zentralen Regionen der Cornea zeigten, dass Zellen aus der Randregion ein schnelleres Wachstum in Kultur aufweisen und in ihrer Morphologie den Zellen in vivo mehr ähneln als Zellen, die aus dem zentralen Bereich der Cornea isoliert wurden. Diese Beobachtungen unterstützen die Vorstellung, dass die ausdifferenzierten Zellen kontinuierlich von der Peripherie zum Zentrum der Cornea wandern [Ebato et al., 1987; Eggli et al., 1989]. Die höchste Wachstumsrate zeigten Epithelzellen, die aus der Limbusregion isoliert wurden [Ebato et al., 1988], da sich in diesem Bereich mit großer Wahrscheinlichkeit die epithelialen Stammzellen der Cornea befinden [Schermer et al., 1986].

Ein großer Fortschritt wurde in den letzten Jahren mit der Immortalisierung der Epithelzellen durch Transformation erzielt [Kahn et al., 1993; Araki-Sasaki et al., 1995; Sharif et al., 1998]. Durch die unbegrenzte Kultivierbarkeit dieser Zellen konnten große Mengen an Zellmaterial gewonnen und für Zytotoxizitätsuntersuchungen

[Kruszewski et al., 1997; Offord et al., 1999] oder In-vitro-Permeabilitätsstudien von Substanzen durch epitheliale Schichten [Toropainen et al., 2001] genutzt werden.

Bei der Kultivierung der Epithelzellen werden verschiedene Basalmedien verwendet, meist mit einem Serumzusatz von 5-10 %. Allerdings lassen sich Epithelzellen besser mit serumfreien Medien kultivieren als Endothelzellen [Allman et al., 1976; Chan und Haschke, 1982; Hackworth et al., 1990; Castro-Munozledo et al., 1997].

Die Regenerationsfähigkeit des Cornea-Epithels sorgt dafür, dass nach Verletzungen die entstandenen Lücken in der Augenoberfläche rasch geschlossen werden. Bei Verletzungen, die den limbalen Bereich mit den Stammzellen betreffen, kann es allerdings zu einer Insuffizienz des Epithelgewebes kommen. Folgen sind ein Verlust der Sehschärfe, eine chronische Entzündung und ein Transparenzverlust der Hornhaut. Die Therapie erfolgt durch Transplantation gesunder Stammzellen. Die Ergebnisse dieser Limbustransplantation sind allerdings nicht befriedigend, daher wurden in jüngster Vergangenheit zahlreiche Untersuchungen zur Kultivierung humaner cornealer Epithelzellen auf Amnionmembranen mit dem Ziel der Kultur von Limbusepithelzellen zur Transplantation durchgeführt [Meller und Kruse, 2001; Solomon et al., 2001; Koizumi et al., 2002; Di Girolamo et al., 2007].

2.4.1.3 Corneale Stromazellen

Die Gewinnung von Stromazellen aus der Cornea bereitet in der Regel keine Probleme. Sie lassen sich gut mithilfe der Explantattechnik gewinnen. Diese Tatsache nutzten Stocker et al. (1958), um reine Fibroblastenkulturen nach Abtrennung von Epithel- und Endothelgewebe zu gewinnen. Neben den Explantattechniken [Adachi und Pollak, 1966; Easty et al., 1986] wurden auch enzymatische Methoden genutzt, um stromale Kulturen anzulegen [Chan und Haschke, 1982; Minami et al., 1993; Schneider et al., 1997].

Detaillierte Untersuchungen an kultivierten Fibroblasten wurden sowohl zur Synthese extrazellulärer Substanzen, wie Kollagen oder Glykosaminoglykanen [Yue et al., 1978, 1983; Bleckmann und Kresse, 1979; Takahashi et al., 2001] durchgeführt, als auch zur Untersuchung des Einflusses auf Wachstum und Differenzierung cornealer Epithelzellen bei Kokultivierung [Tseng et al., 1996; Pancholi et al., 1998]. In Anwesenheit von Fibroblasten oder bei Kultivierung in einem mit Fibroblasten konditionierten Medium zeigten die Epithelzellen eine verstärkte Proliferation [Chan und Haschke, 1983].

Für die Kultivierung der stromalen Zellen wird in der Regel ein Medium mit einer Serumkonzentration von 10 % eingesetzt. Erste serumfreie Kultivierungsversuche zeigten ein Überleben von stromalen Zellen in Kultur, allerdings nur in einem proliferativen Ruhezustand [Denk et al., 1998].

2.4.2 Organotypische Zellkulturmodelle und deren Verwendung

Nach den Untersuchungen zur Isolation und Charakterisierung der einzelnen Corneazellen kam man zu dem Ergebnis, dass sich die separierten Zellen nur bedingt wie das Gewebe in vivo verhalten. Gerade bei der Kultivierung der epithelialen Zellen spielt neben dem Einfluss von Medienbestandteilen und Substraten auch eine Kokultivierung mit Fibroblasten eine große Rolle (s. Abschnitt 2.4.1.3). So konnte gezeigt werden, dass corneale Epithelzellen auf einem Kollagensubstrat [Geggel et al., 1985] schon eine verbesserte Proliferation zeigten [He und McCulley, 1991]. Wurde ein fibroblastenhaltiges Substrat genutzt, konnte die Bildung von Desmosomen, Hemidesmosomen, Keratinen und Basalmembrankomponenten nachgewiesen werden [Friend et al., 1982; Ohji et al., 1994; Parnigotto et al., 1998; Germain et al., 1999].

Das erste Modell mit allen drei Zelltypen beschrieben erstmalig Minami et al. (1993) mit isolierten bovinen Zellen. Sie übertrugen die Methode der Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze von den Hautmodellen [Prunieras et al., 1983] und konnten einen entscheidenden Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung der Epithelzellen beobachten. Ein weiteres Modell von Zieske et al. (1994), bestehend aus Epithel- und Stromazellen vom Kaninchen sowie einer kontinuierlichen Endothelzelllinie der Maus, konnte zusätzlich einen starken Einfluss der Endothelzellen auf die Proliferation und Expression von Basalmembrankomponenten der Epithelzellen zeigen.

Das erste komplette humane Corneaäquivalent wurde von Griffith et al. (1999) entwickelt. Dabei kamen bei allen drei Zelltypen immortalisierte Zelllinien zum Einsatz. Untersucht wurden Morphologie, Transparenz, biochemische Marker sowie Ionen-Transport im Vergleich zum Originalgewebe. Dabei zeigte das Gewebeäquivalent starke Ähnlichkeiten mit der Cornea. Als mögliche Anwendungsgebiete nannten Griffith et al. Toxizitätsuntersuchungen und Arzneistoffanalysen, beschrieben aber auch die Möglichkeit für zukünftige Entwicklungen bezüglich implantierbarer Gewebe. Permeationsstudien mit Arzneistoffen zur ophthalmologischen Anwendung an

kompletten Corneaäquivalenten wurden von Tegtmeier et al. (2001) und Reichl und Müller-Goymann (2001) beschrieben. Die Permeationsbarriereeigenschaften der bovinen, porcinen und humanen Cornea-Konstrukte ähneln stark denen exzidierter Hornhäute und bieten deshalb eine Alternative zu ihnen. Die meisten In-vitro-Modelle für Permeationsuntersuchungen bestehen hauptsächlich aus Epithelzellen, die mit und auch ohne Fibroblasten kultiviert werden. Die Kultivierung erfolgt sowohl submers als auch an der Luft-Medium-Grenze. Dabei werden häufig Kaninchenzellen als Grundlage genutzt [Kawazu et al., 1998; Chang et al., 2000]. Goskonda et al. (1999) etablierten eine kontinuierliche Zelllinie von Epithelzellen des Kaninchens (SIRC), die zur Untersuchung neuer Mydriatika genutzt wurde und heutzutage weit verbreitet und gut untersucht ist [Tak et al., 2001; Majumdar et al., 2003]. Allerdings ist immer noch strittig, ob es sich wirklich um eine Epithelzelllinie oder um veränderte Fibroblasten handelt [Niederkorn et al., 1990]. Ein humanes Epithelmodell für In-vitro-Untersuchungen zur Absorption von Arzneistoffen wurde von Toropainen et al. (2001) entwickelt.

Tabelle 1 bietet eine Übersicht über die cornealen epithelialen Zellkulturmodelle für Permeations- und Toxizitätsuntersuchungen.

In den letzten Jahren wurde versucht für verschiedenste Gewebe organotypische Äquivalente zu kultivieren, um sich den Bedingungen in vivo zu nähern. Dabei wurden zum einen Merkmale auf zellulärer Ebene wie die Interaktionen der Zellen untersucht [Tseng et al., 1996; Pancholi et al., 1998; El-Ghalbzouri et al., 2002] und zum anderen die Gewebe-Äquivalente als In-vitro-Modelle, z. B. für Toxizitäts- oder Permeationsstudien genutzt.

Das größte Gebiet hierbei ist die Kultivierung von humanen Hautäquivalenten. Erste Schritte in Richtung der Anpassung an die Wachstumsverhältnisse in vivo wurden durch Kultivierung auf Kollagensubstraten [Fusenig et al., 1983] und an der Luft-Medium-Grenze [Prunieras et al., 1983] getan. Mit diesen dreidimensionalen Hautäquivalenten, die histologisch dem Originalgewebe ähnelten, wurden Zytotoxizitätstests, Wundheilungsstudien, Permeationsuntersuchungen und biochemische Tests durchgeführt [Bell et al., 1983, 1991; Asselineau et al., 1986; Gay et al., 1992; Parenteau, 1994; Wilkins et al., 1994; Specht et al., 1998; Asbill et al., 2000; El-Ghalbzouri et al., 2002; Hoffmann und Müller-Goymann, 2005].

Tabelle 1: Übersicht über corneale Zellkulturmodelle und ihre Verwendung

Autor	Modelltyp	Spezies	Verwendung	Auswertung
Grant et al. (1992)	Epithel (primär)	Kaninchen	Toxizität	Tenside
Sina et al. (1992)	Epithel (primär)	Kaninchen	Toxizität	Verschiedene Chemikalien
Minami et al. (1993)	Komplett (primär)	Rind	Morphologie	
Zieske et al. (1994)	Komplett (primär/immort.)	Kaninchen Maus	Morphologie	
Schneider (1996)	Komplett (primär)	Schwein	Toxizität	Modellirritantien (Triton, Butanol, Ethanol, DMSO, SDS, Shampoo)
Kruszewski et al. (1997)	Epithel (immort.)	Mensch	Toxizität	Verschiedene Chemikalien und Zubereitungen
Kawazu et al. (1998)	Epithel (primär)	Kaninchen	Permeation	Modellsubstanzen (Mannitol, PEG 900)
Parnigotto et al. (1998)	Epithel und Fibroblasten (primär)	Rind	Toxizität	Surfactants
Saarienen-Savolainen et al. (1998)	Epithel (immort.)	Mensch	Toxizität	Arzneistoffe, Konservierungsmittel und Cyclodextrine
Germain et al. (1999)	Epithel und Fibroblasten (primär)	Mensch	Morphologie, Wundheilung	
Goskonda et al. (1999)	Epithel (immort.)	Kaninchen	Permeation	Arzneistoffe (Phenylephrinester)
Griffith et al. (1999)	Komplett (immort.)	Mensch	Morphologie	
Chang et al. (2000)	Epithel (primär)	Kaninchen	Permeation	Polare Modellsubstanzen (Mannitol, Fluorescein)
Tegtmeyer et al. (2001)	Komplett (primär)	Rind	Permeation	Arzneistoffe (Pilocarpin, Timolol)
Toropainen et al. (2001)	Epithel (immort.) z.T. mit Fibroblasten	Mensch	Permeation	Modellsubstanzen (Mannitol, Fluorescein, Rhodamin B)
Reichl und Müller-Goymann (2001/2003)	Komplett (primär)	Schwein	Permeation	Arzneistoffe (Pilocarpin, Befunolol)
Reichl et al. (2004)	Komplett (primär/immort.)	Mensch	Permeation	Arzneistoffe (Pilocarpin, Befunolol, Hydrocortison)
Burgalassi et al. (2004)	Epithel (immort.)	Kaninchen	Permeation	Arzneistoff (Timolol, z.T. mit Enhancern)
Werner et al. (2008)	Komplett (primär/immort.)	Hund, Kaninchen	Morphologie, Entzündungsparameter	Arzneistoff (Dexamethason)

Ein weiteres großes Gebiet ist die Kultivierung von humanem intestinalen Epithel. Verwendung findet hier die kontinuierliche, gut untersuchte Caco-2-Zelllinie, die aus Zellen eines humanen Kolon-Adenokarzinoms hervorgegangen ist. An diesen intestinalen Modellen werden Transportstudien durch Zellmonolayer durchgeführt [Hidalgo und Li, 1996; Nerurkar et al., 1996; Knipp et al., 1997].

Außer den oben genannten organotypischen Kulturen sind weitere zahlreiche In-vitro-Modelle auf Zellkulturbasis beschrieben, wie z. B. 3D-Modelle bronchialer und alveolarer Epithelien [Gruenert et al., 1995; Elbert, 1998; Savla und Waters, 1998; Forbes, 2000], buccaler Mucosa [Jacobsen et al., 1995; Audus, 1996] sowie der Blut-Hirn-Barriere [Rubin et al., 1991; Stanness et al., 1997; Franke et al., 2000].

Eine umfassende Übersicht zu Zellkultur-Modellen von biologischen Barrieren als In-vitro-Testsysteme für Arzneistoffabsorption und -freigabe gibt Lehr (2002).

2.5 Corneale Absorption von Arzneistoffen

Augenerkrankungen werden in den meisten Fällen durch topische Gabe von Arzneimitteln mittels Applikation von Augentropfen oder -salben in den unteren Bindehautsack behandelt. Dabei kann der Wirkort die Gewebeoberfläche sein, z. B. bei Konjunktivitis. Die meisten Arzneistoffe müssen jedoch durch das Gewebe permeieren, um therapeutisch wirksam zu sein (u. a. bei Glaukom, intraokularer Entzündung, Infektion). Nach der Applikation von Augentropfen werden in der Regel nur 10-30 % der applizierten Dosis in die intraokularen Gewebe aufgenommen, bei wässrigen Pilocarpinzubereitungen sogar weniger als 5 % [Lee und Robinson, 1979]. Die Gründe für diesen hohen Verlust sind die Verdünnung durch Tränenflüssigkeit und Drainage durch nasolacrimale Kanäle, sowie die Verdrängung durch den Lidschlag.

Die Permeation eines topisch applizierten Arzneistoffs am Auge erfolgt hauptsächlich über die Cornea, welche gleichzeitig als Hauptbarriere gegen das Eindringen von Fremdsubstanzen betrachtet wird [Maurice und Mishima, 1984; Burstein und Anderson, 1985; Lee und Robinson, 1986]. Die Funktion als Permeationsbarriere begründet sich aus ihrem heterogenen dreischichtigen Aufbau, der als Lipid-Wasser-Lipid-Wechsel beschrieben werden kann. Das lipophile Epithelgewebe mit seinen tight junctions besitzt dabei eine besondere Dichtigkeit, wodurch auch die erhöhte Durchlässigkeit der Cornea bei Entfernung des Epithels erklärt wird [Huang et al., 1989; Scholz et al., 2002]. Aufgrund dieser besonderen biophysikalischen

Verhältnisse permeieren bevorzugt lipophile, nichtionische Substanzen mit einem hohen Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten durch die Cornea [Huang et al., 1983; Prausnitz und Noonan, 1998]. Im Gegensatz dazu zeigen hydrophile Stoffe ein deutlich schlechteres Permeationsvermögen. Für hydrophile Moleküle ist die corneale Arzneistoffpassage durch die äußersten Schichten des Epithels reglementiert, es sei denn sie besitzen ein sehr kleines Molekulargewicht. In diesem Fall kann ein parazellulärer Penetrationsweg über wassergefüllte Poren angenommen werden [Grass und Robinson, 1988a, 1988b; Grass et al., 1988c]. Große hydrophile Moleküle können über die Bindehaut beziehungsweise über die Sclera permeieren, sie erreichen den Wirkort auf einem nicht-cornealen Weg [Bertelmann et al., 2003]. Im Falle dissoziierender Stoffe passiert die nichtionisierte Form des Arzneistoffs das Epithel in der Regel leichter als die ionisierte Form (Abbildung 6). So permeiert z. B. die freie Pilocarpinbase 2-3 mal leichter durch die Cornea als die ionisierte Form [Mitra und Mikkelsen, 1988].

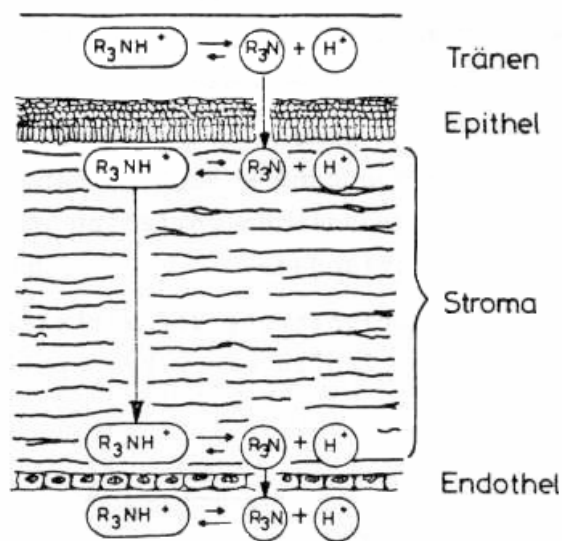


Abbildung 6: Modellhafte Darstellung der Permeation von Alkaloidbasen durch die Hornhaut [Kinsey, 1983]

Beim physiologischen pH-Wert von 7,4 trägt das Gewebe der Cornea negative Ladungen, weshalb der Interzellularraum besser für kationische Moleküle permeabel ist als für anionische [Rojanasakul et al., 1992]. Bei einer Untersuchung von Liaw et al. (1992) konnte gezeigt werden, dass die Durchlässigkeit der Cornea für die kationische Aminosäure L-Lysin um das 2-3 fache höher war als für die anionische Aminosäure L-Glutaminsäure.

Bei den meisten klassischen ophthalmologischen Arzneistoffen handelt es sich um niedermolekulare Verbindungen ($M_{\text{rel}} < 500 \text{ Da}$). Die Molekülgröße hat in diesem Bereich keinen Einfluss auf das Permeationsvermögen der Substanzen [Prausnitz und Noonan, 1998].

Das corneale Epithel stellt nicht nur eine Permeationsbarriere dar, sondern ist auch metabolisch aktiv [Deshpande et al., 2000], zum Beispiel werden Pilocarpin und Epinephrin nach okularer Applikation teilweise metabolisiert [Lee et al., 1980, 1982]. Man kann sich diese metabolische Aktivität durch die Gabe von Prodrugs wie Latanoprost oder Mycophenolatmofetil zunutze machen [Bertelmann et al. 2003].

Das Stroma mit seinen großen, hauptsächlich aus Wasser bestehenden Bereichen stellt keine lipophile Barriere dar. Die Permeabilität zeigt keinen offensichtlichen Zusammenhang mit dem Verteilungskoeffizienten einer Substanz, allerdings wirkt sie als limitierende Barriere bei stark lipophilen Substanzen, die das Epithel problemlos durchdringen können [Prausnitz und Noonan, 1998].

Das Endothel besteht aus einem Zellmonolayer mit interzellularen Verbindungen. Es stellt eine durchlässigere lipophile Barriere als das Epithel dar und hat keinen direkten limitierenden Effekt auf die Permeation.

Die in vitro erhaltenen Daten können natürlich nur unter Vorbehalt auf die In-vivo-Situation am Auge übertragen werden, da wichtige Faktoren, wie zum Beispiel die Tränensekretion oder der Lidschlag, die zum Verlust von Arzneistoff führen, vernachlässigt werden. Darüber hinaus existiert auch hier die Problematik der Übertragbarkeit der an Tiermodellen gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen [Maurice und Mishima, 1984; Lee und Robinson, 1986]. Als Orientierungshilfe zur Bewertung der Permeabilität von Stoffen und dem Einfluss von Formulierungen sind In-vitro-Permeationsstudien allerdings von erheblicher Bedeutung.

Die Quantifizierung der Ergebnisse von In-vitro-Permeationsuntersuchungen kann über die Berechnung des Arzneistoffflux J erfolgen, der sich aus der permeierten Arzneistoffmenge pro Zeit- und Flächeneinheit ergibt [Flynn et al., 1974]. Voraussetzung sind Perfect-sink-Bedingungen, also eine Arzneistoffkonzentration im Akzeptorkompartiment, die unter 10 % der Sättigungskonzentration des Arzneistoffs liegt und eine annähernde Konstanz der Ausgangskonzentration C_0 des Arzneistoffs im Donatorkompartiment während der Dauer des Permeationsexperiments. Sind diese Voraussetzungen gegeben, lässt sich der Arzneistoffflux J nach Gleichung 1 beschreiben.

$$J = P \cdot c_0$$

$$J = \text{Arzneistoffflux } [g/cm^2 \cdot s]$$

$$P = \text{Permeationskoeffizient } [cm/s]$$

$$c_0 = \text{Arzneistoffausgangskonzentration im Donator } [g/cm^3]$$

Gleichung 1

Der in Gleichung 1 enthaltene Permeationskoeffizient P ergibt sich aus dem scheinbaren Diffusionskoeffizienten D_s [cm^2/s] des Arzneistoffs im Gewebe, dem Verteilungskoeffizienten K Donor/Cornea sowie der effektiven Dicke der Permeationsbarriere h [cm] (Gleichung 2).

$$P = \frac{D_s \cdot K}{h}$$

Gleichung 2

Werden die Ergebnisse einer Permeationsuntersuchung graphisch dargestellt, indem man die permeierte Menge an Arzneistoff gegen die Versuchsdauer aufträgt, so lässt sich im steady-state-Bereich, welcher sich im linearen Abschnitt des Graphen befindet, der Arzneistoffflux J und durch Bezug auf die Ausgangskonzentration c_0 im Donator der Permeationskoeffizient P errechnen (Gleichung 3), der als Maß zur Beurteilung der Permeationsbarriereeigenschaften von exzidierten Hornhäuten und Zellkulturmodellen herangezogen wird.

$$P = \frac{J}{c_0}$$

Gleichung 3

Je nachdem ob der Diffusionskoeffizient des Arzneistoffmoleküls im Arzneimittel größer ist oder der Permeationskoeffizient in der Cornea, ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Freisetzung aus der Arzneiform oder die Permeation. Für wässrige Augentropfen geht man von letzterem Fall aus.

2.6 Tierversuche und Zellkultursysteme als Alternativmethoden

Die Untersuchungen von vielen grundlegenden zellulären Prozessen können heutzutage mithilfe von Zellkultursystemen durchgeführt werden, ohne dass Versuchstiere im klassischen Tierexperiment zu Schaden kommen. Es ist allerdings zu beachten, dass Tiere auch zur Gewinnung von Organ- und Zellkulturen und der

Herstellung von Seren und anderen Zusätze benötigt werden. Trotzdem stellen die Methoden der Zellkultur häufig einen sinnvollen Ersatz für Tierversuche dar [Schmitz, 2007].

Laut Tierschutzbericht von 2007 wurden im Jahre 2005 in Deutschland ca. 2,4 Millionen Tiere zu wissenschaftlichen und bestimmten anderen Zwecken verwendet. 54,5 % der Tiere wurden für die Erforschung von Erkrankungen von Menschen oder Tieren eingesetzt. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf Infektionskrankheiten, Herz- und Kreislauferkrankungen, Krebserkrankungen sowie Störungen des menschlichen Nervensystems. 18,8 % der Tiere wurden für rechtlich vorgeschriebene Versuche bei der Herstellung oder Qualitätskontrolle von Produkten für die Human-, Zahn- oder Veterinärmedizin bzw. für toxikologische Sicherheitsprüfungen eingesetzt. Dazu kommen 24,5 % Wirbeltiere, die für wissenschaftliche Zwecke getötet und anschließend für die oben genannten Zwecke weiter verwendet wurden (§ 4 Abs. 3 TierSchG). Darunter fallen auch Tiere, deren Organe oder Gewebe zur Organ- oder Zellkulturgewinnung eingesetzt wurden und unter anderem zur Erforschung und Entwicklung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch genutzt wurden. Die restlichen Tiere wurden zu Aus- und Weiterbildungs- oder sonstigen Zwecken eingesetzt. Für Produkte oder Stoffe, die vorrangig in Kosmetikartikeln verwendet werden, dürfen keine Tierversuche mehr eingesetzt werden [Tierschutzbericht 2007].

Ausgangspunkt für die Entwicklung von Alternativmethoden für Tierversuche war die Arbeit von Russell und Burch (1959) mit ihrer Regel der 3 R – refine, reduce, replace. Mit der Verfeinerung der Testmethoden sollen Stress, Schmerzen und Leiden der Tiere auf ein Minimum reduziert werden. Die Reduktion der eingesetzten Tiere wird durch sinnvolle Voruntersuchungen und schrittweise Vorgehensweisen, bis hin zum vollständigen Ersatz von Tierversuchen möglich.

Der Ersatz von Tierversuchen kann u. a. durch In-vitro-Untersuchungen an isolierten Zell- und Organkulturen, durch physikalisch-chemische Methoden oder durch Computer-Modelling und neuronale Netzwerke erreicht werden [Abraham et al., 1998a, b; Agatonovic-Kustrin et al., 2003]. Ein In-Vitro-Modell kann zwar nie die komplexen Verhältnisse am lebenden Organismus widerspiegeln, mit Hilfe mehrerer Alternativmethoden lassen sich jedoch verschiedene Teilinformationen gewinnen, die zusammen betrachtet hinreichend genau an die Ergebnisse des zu ersetzenden Tierversuches herankommen.

2.6.1 Draize-Test

Im Rahmen der toxikologischen und dermatologischen Untersuchung chemischer und pharmazeutischer Substanzen und Zubereitungen spielen Prüfungen der Augen-, Haut- und Schleimhautverträglichkeit eine wichtige Rolle. Das bis heute anerkannte und angewandte Verfahren, welches Basisinformationen zur okulären und dermalen Verträglichkeit von Substanzen liefert, ist der Draize-Test, der 1944 von Draize et al. entwickelt wurde. Bei diesem Test wird die Irritationswirkung von chemischen Substanzen, Substanzgemischen und fertigen Produkten auf Augen, Haut und Penis des Kaninchens untersucht, um die Schädlichkeit von Substanzen für Augen, Haut und Schleimhaut des Menschen abzuschätzen. Das Spektrum der Irritationen reicht von nicht feststellbaren Reizungen bis hin zu schweren Verätzungen und Schädigungen.

Nach den OECD-Guidelines 404 (Acute Dermal Irritation/Corrosion) und 405 (Acute Eye Irritation/Corrosion) muss im Vorfeld die aktuelle Datenlage zu der zu untersuchenden Substanz ausgewertet werden. Dabei werden Ergebnisse bereits existierender Studien an Mensch und Tier, Beweise von ätzender und/oder reizender Wirkung von strukturverwandten Substanzen, starke Azidität oder Basizität und Ergebnisse aus validierten In-vitro- oder Ex-vivo-Studien zur Hautirritation begutachtet und bewertet. Sind die bestehenden Daten ausreichend, muss kein weiterer Test erfolgen. Der nächste Schritt bei unzureichender Datenlage oder neuen Substanzen ist die Durchführung von validierten und akzeptierten In-vitro-Tests (s. Abschnitt 2.6.2). Daran schließt sich die In-vivo-Untersuchung auf dermale Reizwirkung der Substanzen und Zubereitungen an. Soll die okuläre Reizwirkung untersucht werden, wird die In-vivo-Untersuchung auf Augenreizung erst durchgeführt, wenn im vorhergehenden Hauttest keine starken Schädigungen zu beobachten waren. Der Grund für dieses stufenweise Vorgehen ist die Vermeidung unnötiger Tierversuche und die Verminderung der Schmerzen für die Versuchstiere.

Beim modifizierten Draize-Eye-Test wird einem Kaninchen 0,1 ml bzw. 0,1 g der Testsubstanz in ein Auge gegeben, das andere Auge dient dabei als Kontrolle. Die Reaktion des behandelten im Vergleich zum unbehandelten Auge wird anschließend in bestimmten Zeitabständen (1, 24, 48 und 72 Stunden) beobachtet. Der Beobachtungszeitraum wird so lang gewählt, dass eine Reversibilität bzw. Irreversibilität zu erkennen ist, maximal über 21 Tage. Je nach Stärke der an der Iris, Binde- und Hornhaut auftretenden Reaktionen wird die Testsubstanz als schwach,

mittel oder stark schädigend eingestuft. Ebenso wird die Dauer dieser Veränderungen für den Fall berücksichtigt, dass es sich um eine vorübergehende Schädigung handelt. Eine Übersicht über die auftretenden Reaktionen und ihre Bewertung gibt Tabelle 2.

Tabelle 2: Einstufung der Augenläsionen nach OECD-Guideline 405 von 2002

Hornhaut	
Trübung: Grad der Dichte an der undurchsichtigsten Stelle*	
Keine Trübung oder Geschwürbildung.....	0
Verteilte oder unscharfe trübe Bereiche; Einzelheiten der Iris klar zu erkennen.....	1
Leicht erkennbarer durchscheinender Bereich; Einzelheiten der Iris leicht verschleiert.....	2
Perlmuttartiger Bereich; Pupillengröße schwach erkennbar; Keine Einzelheiten der Iris erkennbar.....	3
Undurchsichtige Hornhaut; Iris ist nicht erkennbar durch die Trübung.....	4
* Die Fläche der cornealen Trübung sollte notiert werden.	
Iris	
Normal.....	0
Erkennbar vertiefte Falten, Blutstauung, Schwellung, leichte Rötung oder Einblutung im Bereich der Hornhaut; Iris reagiert auf Licht.....	1
Schwere Blutung, grobe Zerstörung oder keine Lichtreaktion.....	2
Bindehaut	
Rötung (bezieht sich auf die Bindehaut der Lider und des Augapfels; ausgenommen Hornhaut und Iris)	
Normal.....	0
Einige gerötete Blutgefäße (Einblutung).....	1
Diffus rot gefärbt, Einzelgefäße sind nur schwer zu erkennen.....	2
Diffuse kräftige Rotfärbung.....	3
Bindehautödem	
Schwellung (bezieht sich auf die Lider und/oder die Nickhaut)	
Normal.....	0
Leichte Schwellung.....	1
Deutliche Schwellung mit teilweisem Umklappen der Lider.....	2
Schwellung mit halbgeschlossenen Lidern.....	3
Schwellung mit mehr als halbgeschlossenen Lidern.....	4

Aus der Wirkung am Kaninchenauge kann dann auf die Wirkung beim Menschen geschlossen werden. In Vergleichen hat sich das Kaninchenauge als empfindlicher als das menschliche Auge erwiesen, was dem Test eine zusätzliche Sicherheit gibt. Wegen der starken Schmerzen, die die Kaninchen bei dem Test erleiden müssen, handelt es sich um den am heftigsten kritisierten toxikologischen Tierversuch. Darüber hinaus ist er auch aus wissenschaftlichen Gründen umstritten. Zum einen weil die Ergebnisse von subjektiven Einschätzungen abhängen und zum anderen weil die Daten ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden [Spielmann, 1997]. Obwohl der Draize-Test seit langem umstritten ist, gibt es bis heute auf OECD-Ebene keine akzeptierte alleinige Alternativmethode [OECD-Guideline, 2002a, b].

2.6.2 Alternative Zytotoxizitätsuntersuchungen

An der Entwicklung von Alternativmethoden zum Draize-Test wird seit Jahren geforscht, und es wurden bereits mehrere Validierungsstudien [Balls et al., 1995; Brantom et al., 1997; Spielmann et al., 1991; Gettings et al., 1994, 1996, 1996a; Bradlaw und Wilcox, 1997; Ohno et al., 1999] durchgeführt. Da das Auge jedoch ein sehr komplexes System ist, das auf Reizungen mit verschiedensten Reaktionen antwortet, ist es bisher noch nicht gelungen, die ablaufenden Prozesse komplett durch In-vitro-Modellsysteme zu ersetzen. Trotz der Schwierigkeiten wurden einige Erfolg versprechende In-vitro-Tests entwickelt, die wichtige Parameter der Augenirritation erfassen können. Die meisten dieser Tests lassen sich in drei Gruppen einteilen: Organmodelle, Zellkultur- und physikochemische Methoden.

Die **Organmodelle** stellen die komplexesten Vertreter der Alternativmethoden dar. Die Versuche werden in der Regel an tierischen Organen ex vivo durchgeführt. Zu dieser Gruppe gehören der BCOP- (Bovine Corneal Opacity Permeability), der IRE- (Isolated Rabbit Eye) und der CEET-Test (Chicken Enucleated Eye Test) [Gautheron et al., 1992; Prinsen und Koeter, 1993]. Die Testsubstanzen werden dafür auf die Cornea oder das isolierte Auge gegeben und für einen bestimmten Zeitraum (1 h bzw. 10 s) einwirken gelassen. Die Irritation wird anhand der Trübung, der Schwellung und/oder der Permeabilität für Fluorescein bestimmt [Gautheron et al., 1994; Lewis et al., 1994; Prinsen und Koeter, 1993]. Zu den Organmodellen zählen auch Tests am befruchteten und bebrüteten Hühnerei, wie der HET-CAM- (Henn's

Egg Test - Chorion Allantoic Membrane) und der CAMVA-Test (Chorion Allantoic Membrane Vascular Assay) [Luepke, 1985; Leighton et al., 1985]. Nach Applikation der zu testenden Substanz auf die Chorionallantoismembran (CAM) eines Hühnereis kann man Gewebeschädigungen in Form von Gefäßerweiterungen, Blutungen und Eiweißkoagulation beobachten.

Die **Zellkulturmethoden** erfassen in der Regel jeweils nur bestimmte zelluläre Parameter, haben allerdings den großen Vorteil, dass für sie kein Tier getötet werden muss. Der Neutralrottest [Borenfreund und Puerner, 1985] basiert auf der Aufnahme des Farbstoffs Neutralrot in die Lysosomen vitaler Zellen. Der Farbstoff liegt bei physiologischem pH-Wert sowohl in der dissoziierten als auch in der undissoziierten Form vor, gelangt durch nicht-ionische Diffusion in die Zellen und wird dort an anionische Bereiche der lysosomalen Matrix gebunden. Je vitaler die Zellen sind, desto mehr Farbstoff kann photometrisch bestimmt werden. Beim Erythrozyten-Test (Red Blood Cell Haemolysis) [Pape et al., 1987] werden Membranschäden über die Freisetzung von Oxyhämoglobin und die Denaturierung von Eiweiß bestimmt. Der Fluorescein-Leakage-Test [Tchao, 1988] zeigt die schädigende Wirkung von Irritantien anhand der Zerstörung der Zellintegrität eines Monolayers. Eine Kultur von Hunde-Nieren-Epithelzellen wird bis zu Konfluenz kultiviert und dann mit dem schädigenden Stoff inkubiert. Danach wird die Durchlässigkeit des Zellmonolayers für Fluorescein bestimmt. Im Silikon-Mikrophysiometer-Test [Bruner et al., 1991; Catroux et al., 1993] werden Änderungen im Zellmetabolismus von Mausfibroblasten mit einem potentiometrischen Sensor erfasst. Es werden die sauren Stoffwechselmetabolite direkt nach Entfernen der Testsubstanz gemessen. Als letzte Zellkulturmethode gibt es noch die Untersuchungen an Gewebeäquivalenten. Dabei wurden in der Vergangenheit hauptsächlich Hautmodelle verwendet, wie das Skin² Model ZK1200 (Advanced Tissue Sciences, USA-La Jolla). Durch den mehrschichtigen Aufbau zeigen diese Gewebeäquivalente eine größere Ähnlichkeit zu den Verhältnissen in vivo als reine Monolayerkulturen. Das Ausmaß der Schädigung kann über die mitochondriale Kapazität oder die Freisetzung von Lactat-Dehydrogenase oder Prostaglandin E₂ bestimmt werden [Osborne et al., 1995].

Zu den **physikochemischen Methoden** zählt der EYTEX-Test (InVitro International, USA-Irvine). Bei diesem biochemischen Test wird die Denaturierung von Proteinen in einer künstlichen Matrix nach Zugabe der Testsubstanz photometrisch erfasst.

Das Ausmaß der Denaturierung ist proportional zur schädigenden Wirkung der Substanz und dementsprechend auch zu einer Trübung der Cornea in vivo.

Zusätzlich gibt es in den Validierungsstudien auch noch einen pflanzenbasierten In-Vitro-Test, den Pollen Tube Growth Test [Kristen, 1997, Kristen et al., 1999]. Die Pollenschläuche der Tabakpflanze zeigen relativ schnelles Spitzenwachstum in Suspensionskultur (100-200 $\mu\text{m}/\text{h}$), ein Zeichen für eine hohe Zellmetabolismusrate. Dieses Wachstum kann durch Zuführen von Substanzen gesteigert oder vermindert werden. Die Masse der Pollenschläuche wird anhand der Trübung der Kultur oder durch Färbung von Wandbestandteilen ermittelt.

Letztendlich konnte sich keine dieser Methoden in den verschiedenen Validierungsstudien als Draize-Test-Ersatz durchsetzen. In Deutschland wird allerdings seit 1992 der HET-CAM-Test in Kombination mit dem Neutralrot-Test von den Behörden zur Einstufung von stark Augen schädigenden Substanzen (R 41) akzeptiert.

3 Material und Methoden

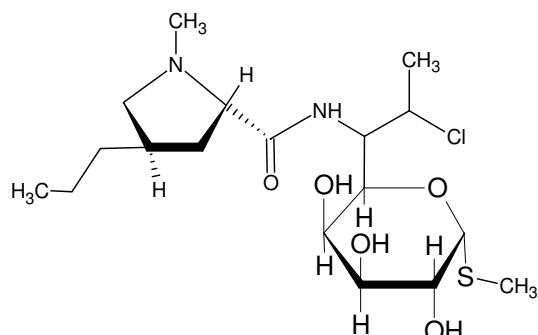
3.1 Material

3.1.1 Biologisches Material

Humanes corneales Gewebe wurde in Form von scleralen Ringen und kompletten Corneae von der Augenklinik der Medizinischen Hochschule Hannover und der Augenklinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf zur Verfügung gestellt. Die Hornhäute waren aufgrund einer zu geringen Endothelzellichte zur Transplantation nicht geeignet, während die scleralen Ringe bei der Transplantation von Spenderhornhäuten zurück blieben.

3.1.2 Arzneistoffe

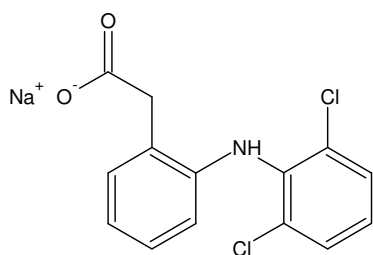
3.1.2.1 Clindamycinhydrochlorid



Clindamycinhydrochlorid (Mr 461,44) ist ein Lincosamid-Antibiotikum mit dem klassischen Einsatzgebiet der Aknetherapie. Es wurde in dieser Arbeit als Vertreter für antibiotische Wirkstoffe eingesetzt. Das Hydrochlorid ist leicht löslich in Wasser und Methanol, löslich in Ethanol und praktisch unlöslich in Aceton.

Clindamycinhydrochlorid (Clindamycin-HCl) wurde freundlicherweise von der Firma Next-Pharma (D-Göttingen) zur Verfügung gestellt.

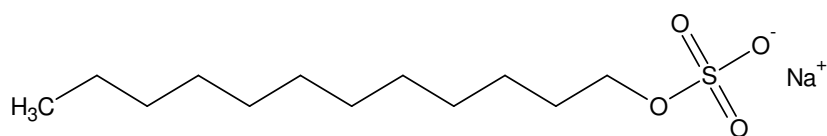
3.1.2.2 Diclofenac-Natrium



Diclofenac-Natrium (Mr 318,1) ist ein nichtsteroidales Antiphlogistikum, das bei nichtinfektiösen Entzündungen des Auges zur entzündungshemmenden, analgetischen und abschwellenden Behandlung eingesetzt wird. Diclofenac-Natrium (Diclofenac-Na) ist in Wasser nur

wenig löslich. Es wurde von der Firma Fagron (D-Barsbüttel) bezogen.

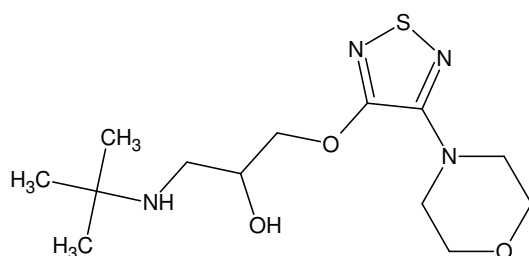
3.1.2.3 Natriumdodecylsulfat



Bei Natriumdodecylsulfat (Mr 288,38) handelt es sich um ein Gemisch aus

Natriumalkylsulfaten, welches hauptsächlich aus dem Natriumsalz des Dodecylsulfats besteht. Es dient in dieser Arbeit als Standardirritans für die Zytotoxizitätsuntersuchungen. Die Substanz löst sich in Wasser und teilweise in Ethanol. Bezugsquelle war die Firma Acros Organics (B-Geel). Im Folgenden wird für die Substanz die übliche Abkürzung SDS für sodium dodecyl sulfate verwendet.

3.1.2.4 Timololhydrogenmaleat



Timololhydrogenmaleat (Mr 432,5) ist ein nicht selektiver β_1, β_2 -Adrenorezeptor-antagonist, der unter anderem zur Glaukombehandlung eingesetzt wird. Der Arzneistoff löst sich in Wasser und ist praktisch unlöslich

in Ether. Das Timololhydrogenmaleat (Timolol-HM) wurde freundlicherweise von der Firma Dr. Mann Pharma (D-Berlin) zur Verfügung gestellt.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturen

Die Arbeiten zur Isolierung und zur Kultivierung der Zellen wurden unter einer Laminar-Air-Flow Werkbank (Heraeus, D-Hanau) durchgeführt. Die benutzten Glas- und Metallgeräte wurden zuvor hitzesterilisiert. Bei den meisten Geräten handelte es sich um sterile Kunststoff-Einmalartikel, die bei den Firmen Costar (D-Fernwald) und Sarstedt (D-Nümbrecht) bezogen wurden. Alle Medien, Medienbestandteile, Pufferlösungen etc. wurden zuvor sterilisiert bzw. steril bezogen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubator (Heraeus, D-Hanau) bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit einem CO₂-Gehalt von 5 % in Kulturgefäßen aus Polystyrol (Sarstedt, D-Nümbrecht).

3.2.1.1 Humane Zellkulturen

3.2.1.1.1 Immortalisierte humane-Cornea-Endothelzellen (HENC)

Bei den verwendeten humanen Endothelzellen handelt es sich um eine immortalisierte Zelllinie, die freundlicherweise von der Augenklinik des Universitätsklinikums Eppendorf zur Verfügung gestellt wurde. Die Primärkultur der cornealen Endothelzellen wurde aus der Hornhaut eines 91-jährigen Spenders nach einer von Engelmann et al. [1988] beschriebenen Methode angelegt. Die Immortalisierung der Zellen erfolgte durch SV 40 Transfektion mittels Elektroporation [Bednarz et al., 2000].

Die Zellen wurden ab Passage 50 für die Arbeit verwendet. Als Wachstumsmedium diente F99, eine 1:1 Mischung von Ham's F12 und Medium 199 (Gibco/Invitrogen, D-Karlsruhe), die mit 5 % fetalem Kälberserum und 1 % Antibiotika/Antimykotika-Lösung supplementiert war. Diese Zelllinie wurde wie unter Abschnitt 3.2.1.2 und 3.2.1.3 beschrieben subkultiviert und kryokonserviert.

3.2.1.1.2 Native humane corneale Fibroblasten (HUFIB)

Die humanen cornealen Fibroblasten wurden nach der Methode von Reichl (2003) isoliert. Das an den scleralen Ringen haftende corneale Gewebe wurde mithilfe von Skalpell und Pinzette abgetrennt. Das Stroma wurde freigelegt und in 2-3 mm große Stücke geschnitten. Diese wurden für 30 min bei 37 °C in einer Petrischale inkubiert und anschließend mit Kulturmedium überschichtet. Aus diesen Explantaten wuchsen die Fibroblasten nach einer Woche aus. Als Kulturmedium wurde Ready-Mix (PAA, A-Pasching), das aus DMEM 10 %, fetalem Kälberserum, 4 mM L-Glutamin und 1 % Antibiotika/Antimykotika-Lösung zusammengesetzt war, verwendet. Auch die nativen humanen Fibroblasten wurden wie unter Abschnitt 3.2.1.2 und 3.2.1.3 beschrieben subkultiviert und kryokonserviert.

3.2.1.1.3 Immortalisierte humane Cornea-Epithelzellen (CEPI)

Bei den ersten in dieser Arbeit eingesetzten humanen Epithelzellen handelt es sich um die immortalisierte Zelllinie CEPI 17 CL 4, die freundlicherweise von der Firma NESTEC (Nestle Research Center, CH-Lausanne) zur Verfügung gestellt wurde. Die

Primärkultivierung der cornealen Epithelzellen erfolgte durch Dispase-Behandlung der Spenderhornhaut einer 73-jährigen Frau. Darauf folgte die Immortalisierung der Zellen durch Behandlung mit einem rekombinanten SV 40 T Antigen retroviralen Vektor [Offord et al., 1999].

Die Zelllinie wurde ab Passage 29 verwendet. Als Wachstumsmedium zur weiteren Standardkultivierung der CEPI-Zellen kam hierbei ein 1:1 Gemisch von DMEM und Ham's F12 (Gibco/Invitrogen, D-Karlsruhe) supplementiert mit 5 % fetalem Kälberserum, 5 µg/ml Insulin, 1,4 µM Hydrocortison, 1 ng/ml epidermaler Wachstumsfaktor (Biochrom, D-Berlin), 10 µg/ml Transferrin (Biofluids/Invitrogen, D-Karlsruhe), 2 mM L-Glutamin und 1 % Antibiotika/Antimykotika-Lösung (Gibco/Invitrogen, D-Karlsruhe) zum Einsatz. Die Kulturflaschen wurden vor der Besiedelung für 24 h mit einer wässrigen 0,1%igen Gelatine-Lösung (Sigma, D-Taufkirchen) bei 37 °C beschichtet. Die CEPI-Zellen konnten ebenfalls wie in Abschnitt 3.2.1.2 und 3.2.1.3 beschrieben subkultiviert und kryokonserviert werden.

3.2.1.1.4 Humane Cornea Epithelzellen (HCE-T)

Bei der zweiten eingesetzten humanen Epithelzelllinie handelt es sich ebenfalls um eine immortalisierte Zelllinie mit der Bezeichnung RCB1384 HCE-T. Die cornealen Epithelzellen einer 49-jährigen Spenderin wurden 1993 durch Behandlung mit einem SV40 adenoviralen Vektor immortalisiert [Araki-Sasaki et al., 1995].

Die Zelllinie wurde ab Passage 59 von der Cell Bank Riken aus Japan bezogen und zur Etablierung eines eigenen Vorrates mit der von Araki-Sasaki et al. (1995) beschriebenen Methode kultiviert. Das Wachstumsmedium, im Folgenden als Sasaki-Medium bezeichnet, besteht aus einem 1:1 Gemisch von DMEM und Ham's F12 mit 5 % fetalem Kälberserum, 5 µg/ml Insulin, 0,1 µg/ml Choleratoxin, 10 ng/ml epidermalem Wachstumsfaktor und 0,5 % DMSO. Die Subkultivierung und Kryokonservierung erfolgte ebenfalls nach Abschnitt 3.2.1.2 und 3.2.1.3.

3.2.1.2 Kultivierung und Subkultivierung

Die Zelllinien wurden unter Standardbedingungen [Freshney, 2005] in den jeweils beschriebenen Wachstumsmedien kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde dreimal pro Woche durchgeführt.

Zur Subkultivierung wurden die Zellen kurz vor Erreichen der vollständigen Konfluenz mit einem salinischen calcium- und magnesium-freien Phosphatpuffer pH 7,4 (PBS-Puffer) (ICN, D-Eschwege) gewaschen und für 3-10 min mit einer Lösung von 0,5 g/l Trypsin und 0,2 g/l EDTA bei 37 °C inkubiert. Der Prozess wurde mit serumhaltigem Medium gestoppt, mögliche Zellcluster durch heftiges Pipettieren vereinzelt, und die Zellen in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 in neue 25-cm²- oder 75-cm²-Zellkulturflaschen (Sarstedt, D-Nümbrecht) überführt.

3.2.1.3 Kryokonservierung der Zelllinien

Zur Kryokonservierung wurden $1-1,5 \cdot 10^6$ Corneazellen nach Trypsinisierung in 1 ml Gefriermedium, das aus DMEM-Wachstumsmedium und 10 % Dimethylsulfoxid (Sigma, D-Deisenhofen) als Kryoprotektivum bestand, suspendiert und eingefroren. Die Zellsuspension wurde 2 h in der Gasphase über flüssigen Stickstoff gehalten, danach in die flüssige Phase (-196 °C) abgesenkt und dort gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen in warmem Wasser zügig erwärmt und langsam in 25 ml Medium suspendiert. Nach dem Anheften der Zellen wurde das Medium gewechselt, um Reste des toxischen Dimethylsulfoxids zu entfernen.

3.2.1.4 Kokultivierung

Für die Kokultivierung der cornealen Fibroblasten mit den Epithelzelllinien CEPI und HCE-T wurden Sixwell-Zellkulturplatten mit Transwell-Einsätzen (Costar, D-Fernwald) verwendet. $5 \cdot 10^4$ corneale Fibroblasten wurden in die Vertiefungen der Zellkulturplatte eingesät und zur Anheftung der Zellen 2 h im Inkubator kultiviert. Anschließend wurden die Filtereinsätze in die Sixwell-Zellkulturplatte eingehängt und eine Suspension von $1,5 \cdot 10^5$ Epithelzellen auf die Membran pipettiert. Die Zellen wurden für 7 Tage im Wachstumsmedium der eingesetzten Epithelzelllinie kultiviert. Die 3,0 µm Porenmembran soll dabei einen Austausch von sezernierten Zell-Substanzen zwischen den Kompartimenten ermöglichen, ohne dass die Zellen Kontakt zueinander haben.

3.2.1.5 Mikroskopie

Die Routinekontrolle der Zellen wurde mittels lichtmikroskopischer Betrachtung der Zellmorphologie mit einem inversen Phasenkontrastmikroskop ID03 (Zeiss, D-Oberkochen) durchgeführt. Zur weiteren Betrachtung und graphischen Dokumentation wurden ein Umkehrmikroskop Olympus IX50 (Olympus, D-Hamburg) mit Phasenkontrasteinrichtung und digitaler Bildaufnahme sowie die Bildbearbeitungssoftware Analysis® (Soft Imaging System, D-Münster) eingesetzt.

3.2.1.6 Wachstumsverhalten der humanen Corneazellen

Um das Wachstumsverhalten der verschiedenen Zellen zu charakterisieren, wurden Wachstumskurven aufgenommen. Anhand dieser sigmoiden Kurven lassen sich typische Parameter wie Latenz-Phase (lag-Phase), Populationsverdopplungszeit in der exponentiellen Wachstumsphase und die Sättigungsdichte der Zellen in der Plateau-Phase ermitteln. Die Zellen wurden mit einer Anzahl von 5.000-10.000/Well in einer 24er-Zellkulturplatte ausgesät. Pro Tag wurde die Zellzahl in 3 Wells bestimmt. Dazu wurde das Kultivierungsmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und mit 0,5 ml Trypsinlösung im Brutschrank inkubiert. Nach dem völligen Ablösen der Zellen wurde 1,0 ml PBS-Puffer zum Stoppen der Reaktion dazugegeben. Die Zellsuspension wurde durch kräftiges Pipettieren vereinzelt und die Zellzahl im Coulter Counter (Beckmann-Coulter, D-Krefeld) bestimmt.

3.2.2 Aufbau des Cornea-Konstrukts

3.2.2.1 Präparation von Rattenschwanzkollagen

Das für die Herstellung der organotypischen Corneaäquivalente benötigte Kollagen wurde durch saure Extraktion aus Rattenschwanzsehnen gewonnen. Die tiefgefrorenen Rattenschwänze wurden eine Minute in Ethanol 70 % eingelegt. Die Sehnen konnten anschließend durch Knicken der Schwanzspitze leicht herausgezogen werden [Freshney, 2005]. Es wurden die Sehnen von zehn Rattenschwänzen nach Zerkleinerung mit einem Skalpell in 1000 ml Essigsäure 3 % unter Rühren über Nacht gelöst. Ungelöste Bestandteile konnten über die Filtration durch Mull entfernt werden. Die filtrierte Lösung wurde für weitere 24 Stunden gegen 4000 ml Essigsäure 0,5 % unter Verwendung der Dialysemembran Spectropore

MWCO 6000-8000 (Spectrum Medical Industries, USA-Los Angeles) dialysiert und anschließend in Aliquoten lyophilisiert. Für den Gebrauch wurde das Lyophilisat in Essigsäure 0,05 % zu der gewünschten Konzentration von 1,6 mg/ml gelöst.

Die Zusammensetzung des so extrahierten Kollagens wurde in einer früheren Untersuchung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt und ergab, dass überwiegend Kollagen Typ I extrahiert wurde [Boozchaloo und Reichl, 1996; Ghiani und Grobe, 2005].

3.2.2.2 Herstellung des humanen Cornea-Konstrukts

Das humane Cornea-Konstrukt wurde nach der von Reichl (2003) entwickelten Methode hergestellt. Der Aufbau der Konstrukte erfolgte schrittweise in Transwell-Einsätzen (Costar, D-Fernwald) für Sixwell-Zellkulturplatten (Abbildung 7). Die Einsätze haben eine Polycarbonat-Membran mit einer Porengröße von 3,0 µm und einem Durchmesser von 24 mm. Sie ermöglichen neben der submersen Kultivierung auch eine Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze.

Als Basis wurde ein zellfreies Kollagengel auf die Membran aufgebracht. Dazu wurde 1 ml Kollagenlösung (1,6 mg/ml) mit 0,3 ml Gelvormischung versetzt. Die Gelvormischung neutralisiert die essigsäure Kollagenlösung und führt so zum Gelieren des Kollagens. Sie enthält 3,9 ml 10×MEM Minimal essential medium (ICN, D-Eschwege), 0,36 ml L-Glutamin, 4,46 ml fetales Kälberserum und 1,25 ml einer NaHCO₃-Lösung 71,2 mg/ml (Sigma). Vor dem Aufsäen der Endothelzellen wurden die Gele mit 1 ml F99 gewaschen. Auf das Bodengel wurde dann eine Zellsuspension mit $2 \cdot 10^5$ humanen Endothelzellen aufgebracht, nach dem Anheften der Zellen (2 h) mit 4 ml Medium F99 gefüttert und für 1 Woche bis zur Konfluenz mit Medium F99 submers kultiviert.

Im nächsten Schritt wurde eine Stroma-Biomatrix aufgebracht. Dazu wurden pro Well $5 \cdot 10^4$ trypsinisierte und abzentrifugierte Fibroblasten in 280 µl DMEM Wachstumsmedium aufgenommen, in weiteren 777 µl Gelvormischung suspendiert, diese Suspension mit 2,57 ml essigsaurer Kollagenlösung (1,6 mg/ml) gut gemischt und zügig auf das Endotheläquivalent aufgebracht. Innerhalb der nächsten Minuten kam es zum Erstarren des Kollagengels. Nach 2 h wurde das Endothel-Stromaäquivalent mit einem Spatel von der Wandung und dem Filter des Transwells gelöst, 5 ml DMEM Wachstumsmedium hinzugefügt und für weitere 4 Tage submers kultiviert.

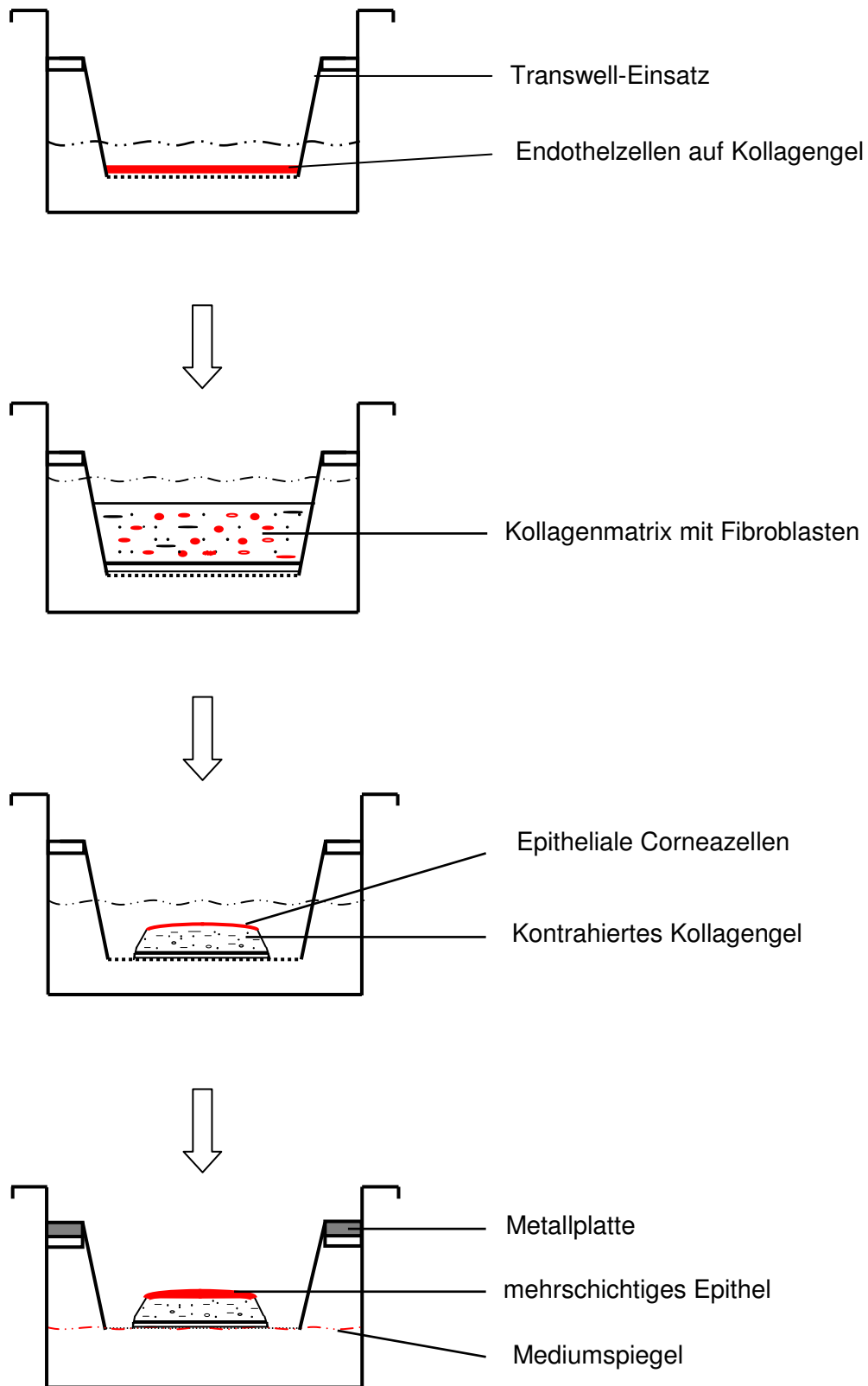


Abbildung 7: Schematische Darstellung des schrittweisen Aufbaus des Corneamodells

Innerhalb dieses Zeitraumes kam es zu einer Kontraktion des Kollagengels. Das Vorhandensein und die Lebensfähigkeit der Stromalen Zellen sind Voraussetzung für die Kontraktion.

Zur Rekonstruktion des Epithelgewebes wurden $1,5 \cdot 10^5$ Epithelzellen (CEPI oder HCE-T) in 50-70 μ l Medium aufgenommen und vorsichtig auf das kontrahierte Kollagengel aufgetropft. Bevor jeweils 5 ml CEPI- bzw. Sasaki-Medium mit 5 % Kälberserum zu den Konstrukten hinzugefügt wurde, wurden sie zur Anheftung der Zellen für 1 h im Inkubator bei 37 °C belassen. Das Konstrukt wurde so bis zur Konfluenz einer Epithelzellschicht für weitere 7 Tage submers kultiviert.

Zur Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels war es nötig, das Konstrukt wie unter In-vivo-Bedingungen nur von unten mit Nährstoffen zu versorgen. Dazu wurden die Transwell-Einsätze mit einer Metallplatte angehoben und das Konstrukt an der Grenzfläche zwischen Medium und Luftumgebung für weitere 10 Tage kultiviert. Gleichzeitig wurde der Serumgehalt des DMEM/F12-Mediums von 5 % auf 2 % reduziert. In dieser Zeit kam es zur Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels.

Die Gesamtkultivierungsdauer betrug 4 Wochen, wobei auch hier das jeweilige Nährmedium dreimal wöchentlich ausgetauscht wurde.

3.2.3 Histologische Untersuchungen

Um strukturelle Besonderheiten und den Einfluss von schädigenden Substanzen auf Gewebe zu untersuchen, bedient man sich histologischer Untersuchungsmethoden. Im Folgenden wird die Einbettung der Cornea-Konstrukte in Technovit 7100, einem kaltpolymerisierenden Kunststoff von Heraeus-Kulzer (D-Wehrheim) [Gerrits und Smid, 1983], mit anschließendem Schneiden und Anfärben der Schnitte vorgestellt.

Die Cornea-Konstrukte wurden in einer 75 mM Phosphatpuffer-Lösung pH 7, die 3,5 % Formaldehyd (Merck) enthielt, über Nacht bei 4 °C fixiert. Die Gewebestücke wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30 %, 50 %, 70 %, 90 % und 3x 100 %) schrittweise dehydratisiert, in einer Mischung aus gleichen Teilen absolutem Ethanol und Technovit 7100 (2-Hydroxyethyl-Methacrylat) 1-2 h eingelegt und anschließend für eine weitere Stunde in reines Technovit 7100 überführt. Danach folgte die Infiltrationslösung bestehend aus 10 ml Technovit 7100 und 100 mg Härter 1 (Dibenzoylperoxid), mit der die Konstrukte über Nacht behandelt wurden. Das Einbetten fand in einer Mischung aus 15 Teilen Infiltrationslösung und 1 Teil Härter 2

(Barbitursäurederivat) statt. Nach zirka 2 Stunden war die Polymerisation bei Raumtemperatur abgeschlossen. Die fertigen Polymerblöcke wurden mit Technovit 7030 auf Kunststoffträger aufgebracht.

Die 5 µm dicken Rotationsmikrotomschnitte (HM 355S, Microm Int. GmbH, D-Walldorf) wurden in Wasser gestreckt und auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Nach der vollständigen Trocknung konnten die Schnitte angefärbt werden.

Als Übersichtsfärbung diente hierbei die Toluidinblau-Färbung. Die Färbelösung bestand aus 1 % Toluidinblau, 1 % Methylenblau und 2 % Natriumtetraborat in Wasser, wurde auf 60 °C erwärmt, und die Präparate darin für 1 min gefärbt. Anschließend wurden die Objektträger mit Wasser abgespült und die überschüssige Farbe mit Ethanol entfernt. Zum Fixieren wurden die Präparate mit dem schnell härtenden Einschlussmedium Eukitt (Poly(butylmethacrylat-co-methyl-methacrylat)) abgedeckt.

Als weitere Färbung wurde die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) durchgeführt, wobei Hämatoxylin die Zellkerne (basophil) blau und Eosin das Cytoplasma (azidophil) rot einfärbt [Romeis, 1989]. Im ersten Schritt wurden die Präparate für 20 min in Hämatoxylin gefärbt und anschließend unter fließendem Wasser für 3 min gebläut. Der zweite Schritt war die Färbung mit Eosin für weitere 45 min. Die Objektträger wurden mit Wasser gespült und die überschüssige Farbe mit Ethanol entfernt. Zum Fixieren wurden die Präparate ebenfalls mit Eukitt abgedeckt.

Die Gewebeschnitte konnten mit einem Photomikroskop Leica DM LM (D-Bensheim) sowie mit dem Umkehrmikroskop Olympus IX50 (siehe 3.2.1.5) ausgewertet werden.

3.2.4 Permeationsuntersuchungen

Zur Bestimmung der Permeabilität der humanen Cornea-Konstrukte und der exzidierten Spender-Cornea wurden vergleichende Permeationsuntersuchungen durchgeführt. Es wurde die Menge an Arzneistoff in Abhängigkeit von der Zeit untersucht, die durch die Konstrukte bzw. die Exzidate permeiert ist.

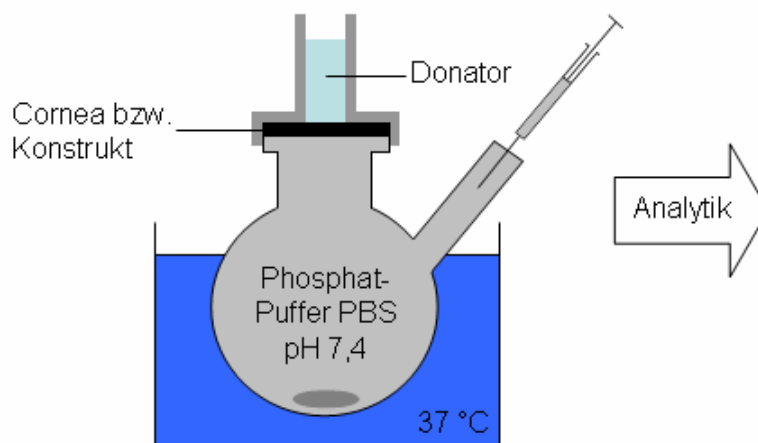


Abbildung 8: Modifizierte Franz-Zelle für Permeationsuntersuchungen

Die Permeationsexperimente wurden mit einer modifizierten Franz-Zelle (Abbildung 8) durchgeführt [Franz, 1975], wobei als Donator die unter Abschnitt 3.1.2. beschriebenen wässrigen Arzneistofflösungen eingesetzt wurden. Um absolute Dichtigkeit zu gewährleisten, wurde der Aufsatz der Franz-Zelle mit einer Silikonzubereitung (Baysilone, Bayer, D-Leverkusen) behandelt. Als Akzeptormedium diente ein salinischer calcium- und magnesium-freier Phosphatpuffer pH 7,4 (PBS-Puffer) (ICN, D-Eschwege), der auf 37 °C temperiert wurde. Die Permeationsfläche betrug 4,91 mm² und das Akzeptorvolumen lag je nach Messzelle zwischen 6,6 und 7,3 ml. Während der Dauer des gesamten Permeations-experiments wurde mittels eines Magnetrührers (400 min⁻¹) für eine gleichmäßige Akzeptordurchmischung gesorgt. Die Probenentnahme von 250 µl erfolgte nach 30 min und dann alle 60 min über einen Zeitraum von 7 h, wobei entnommene Probenvolumina durch temperierten Puffer ersetzt wurden. Um Verdunstungen während der Versuchsdauer zu minimieren, wurden die Öffnungen der Franz-Zellen mit Tesafilm abgedichtet.

Die Arzneistoffkonzentrationen im Akzeptorkompartiment wurden mittels HPLC-Analytik (3.2.5) bestimmt.

3.2.5 HPLC-Bestimmung der Arzneistoffe

Die permeierte Menge an Arzneistoff wurde mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) quantitativ bestimmt. Die Untersuchungen wurden mit einem HPLC-System der Fa. Waters (D-Eschborn) durchgeführt, das aus einem

Pumpensystem 515, einem Autosampler 717 plus (Probenauftrag 20 µl) und einem UV-Detektor 486 zusammengesetzt war. Die Auswertung erfolgte mit einer Waters Millenium 32 Chromatography Manager Software (Waters, D-Eschborn).

Clindamycinhydrochlorid: Reversed Phase RP Säule Nukleosil 100-10 C8 250×4,6 mm (Macherey-Nagel, D-Düren), mobile Phase: 45 Teile Acetonitril (Acros Organics) und 55 Teile einer Lösung von Kaliumdihydrogenphosphat (6,8 g/l), die mit Kaliumhydroxid auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt wurde, Flussrate: 1,2 ml/min [Pharm. Eur. 5, 2005], Retentionszeit: 6,6 min, UV-Detektion: $\lambda=210$ nm, Mehrpunkt-Kalibrierung im Bereich 1-20 µg/ml (Korrelationskoeffizient >0,999).

Diclofenac-Natrium: RP Säule Hypersil ODS 5 µm 125×4 mm (Grom), mobile Phase: 49 Teile Acetonitril (Acros Organics), 49 Teile Wasser und 2 Teile Eisessig, Flussrate: 1,6 ml/min [Baydoun et al., 2002], Retentionszeit: 3 min, UV-Detektion: $\lambda=276$ nm, Mehrpunkt-Kalibrierung im Bereich 0,5-50 µg/ml (Korrelationskoeffizient >0,9999).

Timololhydrogenmaleat: Symmetry Shield RP8 Säule 150×3,9 mm (Waters, D-Eschborn), mobile Phase: 12,5 Teile Acetonitril (Acros Organics) und 87,5 Teile Wasser mit 0,1 % Triethylamin, der pH-Wert von 2,9 wurde mit Eisessig eingestellt, Flussrate: 1,2 ml/min [Tegtmeyer et al. 2004], Retentionszeit: 3,5 min, UV-Detektion: $\lambda=295$ nm, Mehrpunkt-Kalibrierung im Bereich 0,5-10 µg/ml (Korrelationskoeffizient >0,9999).

3.2.6 Physikalische Bestimmungen

3.2.6.1 Dichte

Die Dichtebestimmung flüssiger Systeme erfolgte bei 20 °C mit einem digital rechnenden Dichtemesser DMA 46 (Anton Paar, A-Graz). Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Kalibrierung des Gerätes wurde durch Messung von Wasser und Luft bei 20 °C durchgeführt.

3.2.6.2 Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient

Für Clindamycin-HCl, Diclofenac-Na und Timolol-HM wurde der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient $P_{\text{oct/wasser}}$ bestimmt. Hierzu wurden 5,00 ml der wässrigen, isotonischen Arzneistofflösung (5 mg/ml) und 5,00 ml des vorher über 24 h mit Wasser gesättigten n-Octanols gemischt und 48 h bei 20 °C gerührt. Der Gehalt an Arzneistoff in der wässrigen Phase (c_{wasser}) wurde nach vollständiger Phasentrennung mithilfe der HPLC (s. Abschnitt 3.2.5) für jeweils drei Proben pro Arzneistoff bestimmt. Der Arzneistoffgehalt der n-Octanol Phase (c_{oct}) ergab sich nach Differenzbildung. Der Verteilungskoeffizient $P_{\text{oct/wasser}}$ wird in dieser Arbeit in der Form des dekadischen Logarithmus als Log P angegeben (Gleichung 4).

$$\log P = \log \frac{c_o}{c_w}$$

Gleichung 4

3.2.6.3 Bestimmung der Osmolalität

Zur Bestimmung der Osmolalität der Arzneistofflösungen wurde ein Knauer Halbmikro-Osmometer (Knauer, D-Berlin) verwendet, das mit Wasser und NaCl-Lösung (400 mosmol/kg) kalibriert wurde. Jede Lösung wurde zweimal gemessen und der Mittelwert gebildet.

3.2.6.4 pH-Wert

Der pH-Wert der Lösungen wurde mit einem Microprocessor pH-Meter pH 539 (Wissenschaftliche Technische Werkstätten, D-Weilheim) bestimmt. Die Kalibrierung erfolgte mit Standardpufferlösung pH 4,66 und 9,00 (Merck). Jede Lösung wurde zweimal gemessen und der Mittelwert gebildet.

3.2.7 Zytotoxizitätsuntersuchungen

3.2.7.1 MTT-Test

Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde ein Viabilitätstest, der MTT-Test, durchgeführt. Grundlage für diesen Test ist die Tatsache, dass lebende Zellen in der Lage sind, mit Hilfe ihrer mitochondrialen Dehydrogenasen Tetrazoliumsalze in Formazane

umzuwandeln. Für diese Reduktionsreaktion sind intakte Mitochondrien nötig, die sich nur in lebenden Zellen befinden und bereits kurz nach deren Absterben inaktiv werden [Mosman, 1983]. Beim MTT-Test wird das gelb gefärbte 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem dunkelblauen Formazan umgesetzt (Abbildung 9). Die Vitalität der Zellen kann so relativ einfach bestimmt werden, denn die gemessene Absorption des Formazans liefert ein Maß für die Stoffwechselaktivität der Zellen.

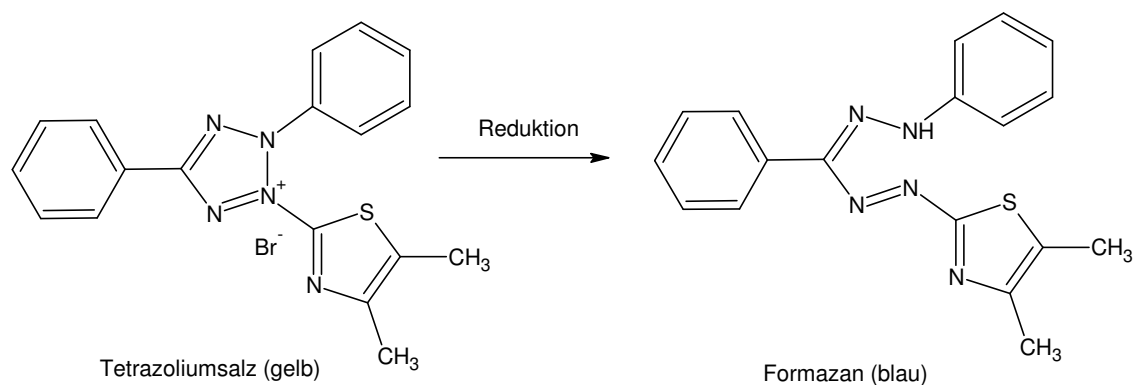


Abbildung 9: Umsetzung vom Tetrazoliumsalz MTT zum Formazan

Der MTT-Test wurde sowohl an den Zellmonolayern der verschiedenen Zelltypen, als auch am Cornea-Konstrukt durchgeführt (Abbildung 10).

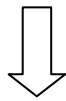
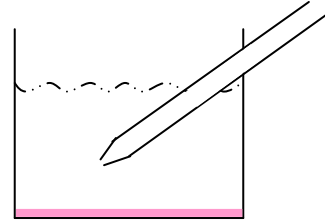
Für die Untersuchungen am Monolayer wurden die drei Zelltypen getrennt voneinander in 24-Well-Platten mit ca. 100.000 Zellen/Well eingesät und bis kurz vor Erreichen der vollständigen Konfluenz für 24-48 Stunden kultiviert. Auf die Zellmonolayer wurden nach Entfernen des Kultivierungsmediums jeweils 500 µl der Arzneistofflösungen in verschiedenen Konzentrationen aufgebracht und für 1 Stunde inkubiert. Als Blindwert diente reiner PBS-Puffer, die höchste Konzentration der Arzneistoffe wurde im toxischen Bereich gewählt, sodass gewährleistet wurde, dass nahezu alle Zellen abgetötet wurden.

Nach der ersten Inkubationszeit wurden 50 µl 0,5 % MTT-Reagenz (Sigma, D-Deisenhofen) auf die Monolayer aufgebracht und weitere 2 Stunden inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurden die Arzneistofflösung und das überschüssige MTT-Reagenz entfernt. Die Freisetzung des Farbstoffs erfolgte durch eine Lysierung der Zellen mithilfe einer 3%igen SDS-Lösung. Als Lösemittel für den Farbstoff diente eine isopropanolische Salzsäure (Isopropanol 100 % mit 0,4 % 10 N Salzsäure).

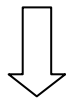
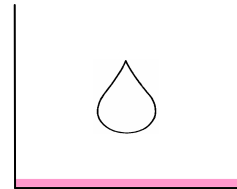
Zellmonolayer (bzw. Konstrukte) in Medium



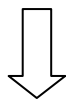
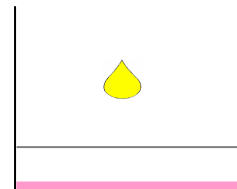
Medium absaugen



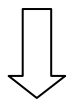
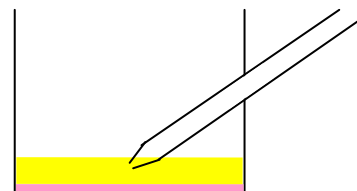
+ 0,5 ml (bzw. 2 ml) toxisches Agens
1 Std. inkubieren bei 37 °C
5 % CO₂-Sättigung



+ 50 µl (bzw. 100 µl) MTT-Lösung
2 Std. inkubieren bei 37 °C
5 % CO₂-Sättigung



Lösung absaugen
(bei Konstrukten eine Biopsie
von 10 mm Ø ausstanzen)



+ 1 ml Aufschlussreagenz
(4 % 10 M HCl, isopr.)
+ 50 µl 3%ige SDS-Lösung
bei 570 nm photometrisch vermessen



Abbildung 10: Ablaufschema MTT-Test an Monolayer und Cornea-Konstrukt (in Klammern)

Anschließend konnte die Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm mit dem Multi-Plate-Reader Power Wave XS (MPR) (Bio-Tek, USA-Winooski) gemessen werden. Die Ermittlung der halbletalen Konzentration (LC_{50}) erfolgte graphisch aus den Vitalitäts-Konzentrations-Kurven.

Die Cornea-Konstrukte wurden wie unter Abschnitt 3.2.2 beschrieben aufgebaut. Nach Entfernung des Kultivierungsmediums erfolgte der weitere Ablauf des MTT-Tests analog der Monolayer-Untersuchung (Abbildung 10). Die verwendeten Volumina an Reagenzien wurden jedoch an das größere Volumen der Sixwell-Platten und die höhere Zellzahl im Konstrukt angepasst. Die Schädigung erfolgte mit 2 ml Arzneistofflösung und die eigentliche Reaktion wurde mit 100 μ l MTT-Reagenz durchgeführt. Nach Entfernen der Arzneistoff- und MTT-Lösung wurde eine Biopsie (\varnothing 10 mm) genommen, diese über Nacht in 5 μ l 3%iger SDS-Lösung und 1 ml Aufschlussreagenz in einer 24-Well-Platte entfärbt, und der extrahierte Farbstoff nach Entnahme der Konstruktstücke ebenfalls bei einer Wellenlänge von 570 nm mit dem Multi-Plate-Reader vermessen. Die Ermittlung der halbletalen Konzentration (LC_{50}) erfolgte graphisch aus den Vitalitäts-Konzentrations-Kurven.

3.2.7.2 Neutralrot-Test

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Zytotoxizität ist die Zählung der lebenden bzw. überlebenden Zellen. Als Vertreter dieser Proliferationstests wurde der Neutralrot-Test durchgeführt (Abbildung 11). Er beruht auf der Aufnahme des wasserlöslichen leicht kationischen Farbstoffs Neutralrot (3-Methyl-3-amino-7-dimethylaminophenazin) über nicht-ionische Diffusion durch die Zellmembran in die Zelle und der Speicherung in den Lysosomen durch Bindung an anionische Strukturen. Tote und membrangeschädigte Zellen können den Farbstoff nicht akkumulieren, und es kommt zu einer verringerten Farbstoffretention während des anschließenden Waschvorganges. Über die aufgenommene Farbstoffmenge, die nach der Extraktion aus den Zellen mittels der UV-Spektroskopie bestimmt wird, kann auf die Anzahl der überlebenden Zellen geschlossen werden [Borenfreund und Puerner, 1985, 1985a].

Die Einsaat und Kultivierung der Zellen erfolgte analog des MTT-Tests. Auf die Zellmonolayer wurden nach Entfernen des Kultivierungsmediums jeweils 500 μ l der Arzneistofflösungen in verschiedenen Konzentrationen aufgebracht und 3 Stunden inkubiert. Als Blindwert diente reiner Phosphatpuffer pH 7,4, die höchste

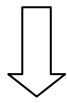
Konzentration des Arzneistoffs lag wie auch beim MTT-Test im toxischen Bereich. Nach der ersten Inkubationszeit wurden die Arzneistofflösungen entfernt, die Zellen mit Phosphatpuffer pH 7,4 gewaschen und 500 µl Neutralrot-Reagenz (50 µg/ml) dazugegeben.

Zur Herstellung des Neutralrot-Reagenz wurde zuvor die entsprechende Menge einer Neutralrot-Stammlösung (3,3 g Neutralrot in 1 l PBS, Sigma, D-Steinheim) mit Ready-Mix-Medium verdünnt. Durch eine Vorinkubation dieses neutralrothaltigen Mediums bei 37 °C und anschließende Zentrifugation wurden eventuell vorhandene Farbstoffkristalle entfernt, um einen Einfluss dieser Kristalle auf das Testergebnis zu verhindern. Mit dem Neutralrot-Reagenz wurde für weitere 3 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und zweimal vorsichtig mit PBS zur Entfernung nicht aufgenommener Neutralrotreste gewaschen. Die Extraktion des Farbstoffs erfolgte nach Lysierung der Zellen mit 1 ml einer Mischung aus 1%iger Essigsäure und Ethanol (50 %). Die von den Zellen absorbierten Neutralrotmengen wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm mit dem Multi-Plate-Reader Power Wave XS (MPR) (Bio-Tek, USA-Winooski) bestimmt. Die Auswertung erfolgte graphisch aus den Vitalitäts-Konzentrations-Kurven.

Die Cornea-Konstrukte wurden wie unter 3.2.2 beschrieben aufgebaut und der Neutralrot-Test wurde analog der Monolayer-Untersuchung (Abbildung 11) durchgeführt, wobei die Flüssigkeitsmengen an das größere Volumen der Sixwell-Platten und die höhere Zellzahl im Konstrukt angepasst wurden. Es wurden sowohl 2 ml Arzneistofflösung als auch 2 ml Neutralrot-Reagenz eingesetzt.

Nach Entfernen der Arzneistoff- und Neutralrot-Lösung wurde eine Biopsie (Ø 10 mm) genommen, diese über Nacht in 1 ml einer Mischung aus 1%iger Essigsäure und Ethanol (50 %) in einer 24-Well-Platte entfärbt und nach Entnahme der Konstruktstücke ebenfalls bei einer Wellenlänge von 540 nm mit dem Multi-Plate-Reader vermessen. Die Ermittlung der halbletalen Konzentration (LC₅₀) erfolgte graphisch aus den Vitalitäts-Konzentrations-Kurven.

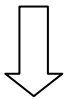
Zellmonolayer (bzw. Konstrukte) in Medium



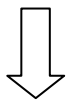
Medium absaugen



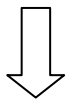
+ 0,5 ml (bzw. 2 ml) toxisches Agens
3 Std. inkubieren bei 37 °C
5 % CO₂-Sättigung



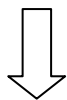
Lösung absaugen und 1x mit PBS waschen



+ 0,5 ml (bzw. 2 ml) Neutralrot-Lösung
3 Std. inkubieren bei 37 °C
5 % CO₂-Sättigung



Lösung absaugen und 2x mit PBS waschen
(Konstrukt: Biopsie 10 mm Ø ausstanzen)



+ 1 ml Aufschlussreagenz (ethanol. Essigsäure)
bei 540 nm photometrisch vermessen

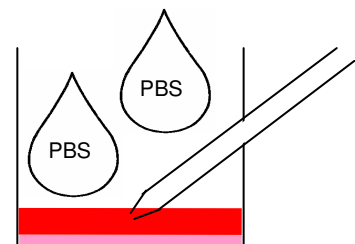
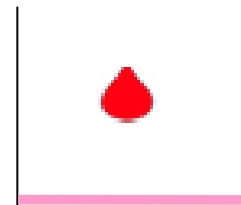
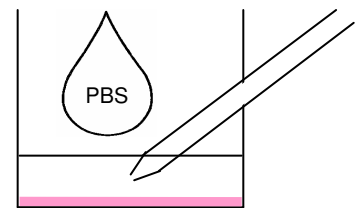
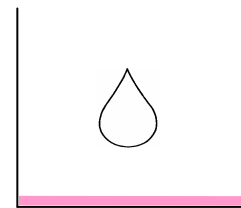
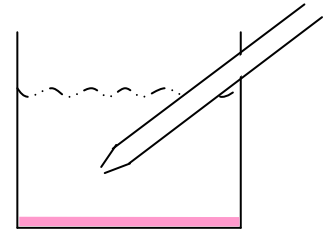


Abbildung 11: Ablaufschema Neutralrot-Test an Monolayer und Cornea-Konstrukt (in Klammern)

3.2.8 Statistische Auswertung der Messdaten

3.2.8.1 Prüfung auf signifikante Unterschiede von Mittelwerten (*t*-Test)

Bei Homogenität der Streuung (kein signifikanter Unterschied der Varianzen gemäß F-Test) erfolgte die Überprüfung auf signifikante Unterschiede bei den Ergebnissen der Permeations- und Zytotoxizitätsuntersuchungen mittels zweiseitigen *t*-Tests. Die Annahme bzw. Ablehnung der Nullhypothese H_0 erfolgte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit α von 5 % [Bauer et al., 2006].

Bei Annahme der Nullhypothese (kein signifikanter Unterschied der Ergebnisse) wurden die Konfidenzintervalle berechnet und die Äquivalenz der Mittelwerte mittels eines Äquivalenztests innerhalb der Akzeptanzgrenzen von $\pm 5\%$ überprüft [Schepers, 2006]. Die Überprüfung ergab in jedem Fall eine Übereinstimmung zwischen den Aussagen „nicht signifikant“ und „Äquivalenz der Mittelwerte“ und wird daher im Folgenden nicht mehr getrennt betrachtet.

Die Darstellungen von Messwerten erfolgt als arithmetisches Mittel \bar{x} \pm Standardabweichung *sd*.

4 Versuchsergebnisse und Diskussion

4.1 Kultivierung und Charakterisierung der humanen cornealen Zellen

Für die Herstellung der organotypischen Cornea-Modelle wurden 4 verschiedene Zelllinien verwendet: Als endotheliale Zellen die HENC-Zelllinie, für das Stroma native humane corneale Fibroblasten und als epitheliale Zellen die beiden Zelllinien CEPI und HCE-T. Die letztgenannte Zelllinie wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig im institutseigenen Zellkulturlabor implementiert. Obwohl die drei übrigen Zellarten bereits in der Dissertation von Reichl (2003) beschrieben wurden, sollen sie zwecks besseren Verständnisses der Zusammenhänge im Folgenden kurz vorgestellt werden.

4.1.1 Kultivierung der cornealen Zelllinien

4.1.1.1 Immortalisierte humane corneale Endothelzellen – HENC

Die immortalisierte Zelllinie HENC wurde in der Arbeit von Reichl et al. (2004) zum Aufbau des Endothels eingesetzt. Es handelt sich dabei um eine SV 40 transformierte Zelllinie mit einer unbegrenzten Lebensdauer [Bednarz et al., 2000]. Da eine Isolierung und Subkultivierung humaner cornealer Endothelzellen bekanntermaßen schwierig durchzuführen ist [Engelmann et al., 1988], werden häufig transformierte Zellen in der Gewebekultur eingesetzt. Ein weiterer Grund ist die geringe Verfügbarkeit von entsprechendem Ausgangsgewebe, weil Spenderhornhäute mit ausreichender Endotheldichte in erster Linie für die Transplantation genutzt werden. Die HENC-Zellen zeigten eine starke Proliferationsfähigkeit und eine hohe Sättigungsdichte in Kultur, die zu dicht gewachsenen konfluenten Monolayern führte. Abbildung 12 zeigt die HENC-Zellen im konfluenten Zustand. Man erkennt dicht gewachsene hexagonale bis polygonale Zellen, die dem morphologischen Erscheinungsbild in vivo sehr ähnlich sind.

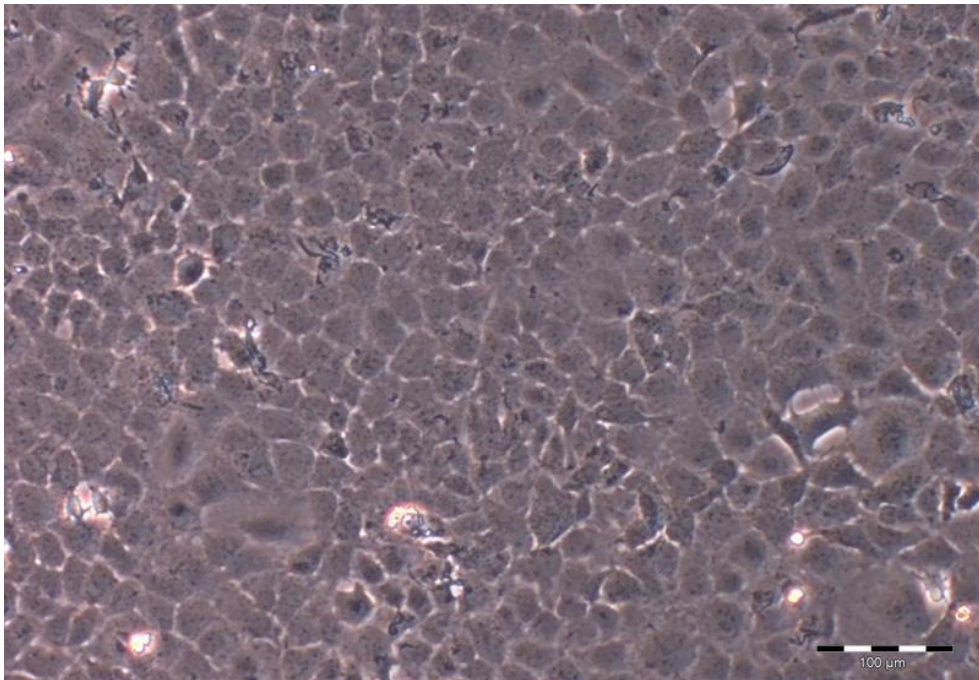


Abbildung 12: Corneale Endothelzelllinie HENC als konfluenter Monolayer, lichtmikroskopische Aufnahme mit Phasenkontrast; Balkenlänge entspricht 100 μm

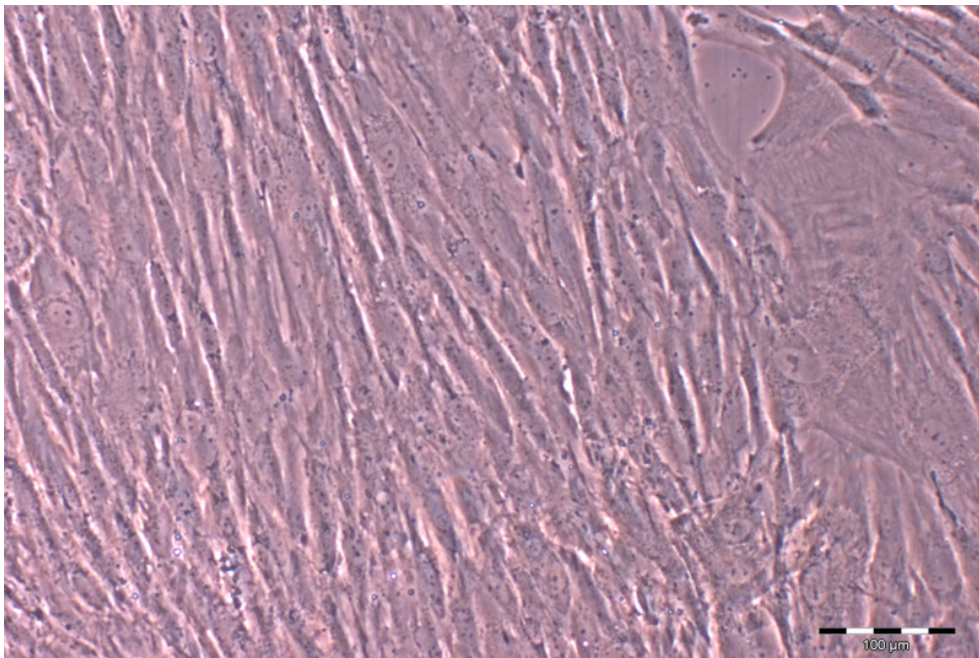


Abbildung 13: Humane corneale Fibroblasten (HUFIB) als konfluenter Monolayer, lichtmikroskopische Aufnahme mit Phasenkontrast; Balkenlänge entspricht 100 μm

4.1.1.2 Native humane corneale Fibroblasten – HUFIB

Die nativen cornealen Fibroblasten wurden ebenfalls von Reichl et al. (2004) zum Aufbau des humanen Cornea-Konstrukts verwendet. Die Isolierung der Zellen erfolgte wie in Abschnitt 3.2.1.1.2 beschrieben. Es wurde immer eine größere Menge isoliert, kryokonserviert und bei Bedarf aufgetaut (s. Abschnitt 3.2.1.3).

Die Fibroblasten zeigten in Monolayerkultur ein lang gestrecktes, spindelförmiges morphologisches Erscheinungsbild (Abbildung 13). Sie wuchsen in Kultur nur einschichtig, auch bei Kultivierung über den Zeitpunkt der Konfluenz hinaus konnte keine Entstehung von Multilayern beobachtet werden. Da es sich um native Zellen handelt, sind die humanen cornealen Fibroblasten nur begrenzt kultivierbar. Für die Versuche in dieser Arbeit wurden Zellen der Passagen 3-13 verwendet.

4.1.1.3 Immortalisierte humane corneale Epithelzellen – CEPI

Die Zelllinie CEPI ist eine immortalisierte Zelllinie humaner cornealer Epithelzellen [Sharif et al., 1998; Offord et al., 1999], die, genau wie die beiden vorhergenannten Zelllinien, Bestandteil des von Reichl et al. (2004) entwickelten humanen Cornea-Konstrukts ist. Die Zellen zeigten eine für transformierte Zelllinien übliche starke Proliferationsrate und eine hohe Sättigungsdichte. Bei der Kultivierung der Zellen im Monolayer konnte man im konfluenten Zustand die typische kopfsteinpflasterartige Morphologie erkennen (Abbildung 14). Wurden die CEPI-Zellen über den Punkt der Konfluenz hinaus kultiviert, waren trotz submerser Kulturbedingungen vereinzelt mehrschichtige Zellcluster zu erkennen. Der überwiegende Teil der Kultur zeigte jedoch eine zelldichteabhängige Proliferationshemmung (Kontaktinhibition), gefolgt vom Absterben der gesamten Kultur. Bei regelmäßiger Subkultivierung zeigte die Zelllinie ein unbegrenztes Zellteilungspotential. Für die Versuche in dieser Arbeit wurden Zellen der Passagen 30-75 verwendet.

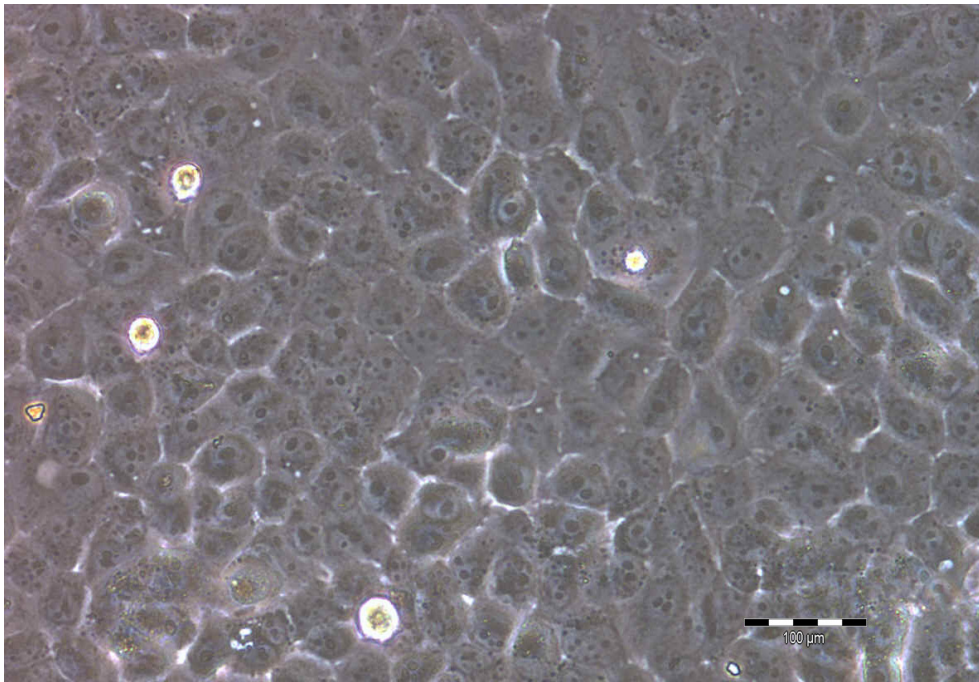


Abbildung 14 Corneale Epithelzelllinie CEPI als konfluenter Monolayer, lichtmikroskopische Aufnahme; Balkenlänge entspricht 100 μm

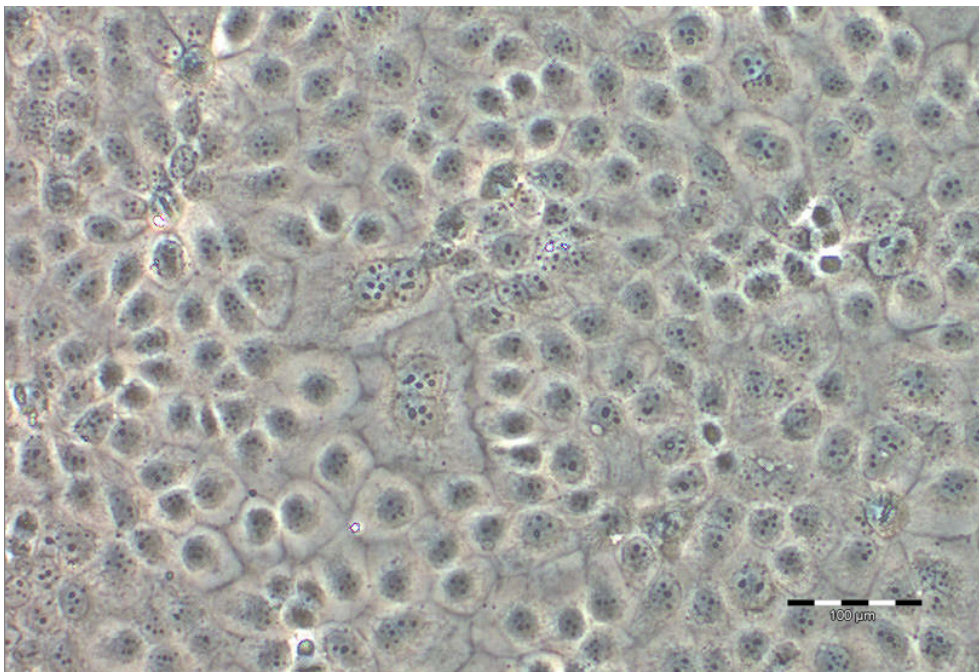


Abbildung 15 Corneale Epithelzelllinie HCE-T als konfluenter Monolayer, lichtmikroskopische Aufnahme; Balkenlänge entspricht 100 μm

4.1.1.4 Immortalisierte humane corneale Epithelzellen – HCE-T

Als weitere Epithelzelllinie wurden die HCE-T-Zellen aus der Cell Bank Riken (Japan) eingesetzt. Auch diese Zelllinie ist immortalisiert und zeigte eine sehr ähnliche Morphologie und ein ähnliches Wachstumsverhalten wie die CEPI-Zelllinie. Man erkennt das für Epithelzellen typische kopfsteinpflasterartige Erscheinungsbild sowie eine hohe Sättigungsdichte im konfluenten Zustand (Abbildung 15). Auch bei dieser Zelllinie kam es vereinzelt zu mehrschichtigen Zellclustern, die allerdings als Vorboten des Absterbens der Kultur aufgrund von Kontaktinhibition angesehen werden konnten. Die Zellen der Passagen 80-106 wurden in dieser Arbeit verwendet.

4.1.2 Wachstumsverhalten der cornealen Zellen

Um zu untersuchen, ob die gewählten Kultivierungsbedingungen für die unterschiedlichen Corneazellarten auch langfristig geeignet sind, wurde das Wachstumsverhalten der Zellen wie in Abschnitt 3.2.1.6 beschrieben bestimmt. Aus den erhaltenen sigmoiden Wachstumskurven lassen sich typische Parameter ersehen, mit denen sich der Zustand einer Kultur beschreiben lässt. Ein Wachstumszyklus beginnt direkt nach der Aussaat mit einer Latenz-Phase (lag-Phase), in der die Zellzahl nicht oder nur wenig zunimmt. Sie stellt eine Adaptionsperiode dar, während der sich die Zellen an das neue Substrat anheften, ausbreiten sowie Enzyme und DNA zur Zellreproduktion neu synthetisieren. Daran anschließend folgt die exponentielle Phase (log-Phase), in der die Zellzahl exponentiell zunimmt. In diesem Bereich lässt sich die Populationsverdopplungszeit der Kultur bestimmen. Gegen Ende der log-Phase wird die Kultur konfluent, und die Wachstumsrate ist reduziert. Hier beginnt die stationäre oder Plateau-Phase. An diesem Punkt lässt sich die Sättigungsdichte der Kultur berechnen. Eine Zusammenfassung über die ermittelten Wachstumsparameter der kultivierten humanen cornealen Zellen ist in Tabelle 3 dargestellt.

4.1.2.1 Wachstumsverhalten der cornealen Endothelzellen

Die Wachstumskurve der cornealen Endothelzellen in F99-Wachstumsmedium unter den in Abschnitt 3.2.1. beschriebenen Kultivierungsbedingungen ist in Abbildung 16 dargestellt. Sie zeigt den typischen sigmoiden Verlauf des Wachstums adhärenter Zellen in einer stabilen Kultur. Nach einer durchschnittlichen Latenz-Phase von 1,0 Tagen ging die Kultur in die exponentielle Phase mit einer Populationsverdopplungszeit von 1,6 Tagen über und erreichte ihr Plateau etwa 15 Tage nach Aussaat. Die Sättigungsdichte lag bei $4,0 \times 10^5$ Zellen/Well.

4.1.2.2 Wachstumsverhalten der cornealen Fibroblasten

In Abbildung 17 ist die Wachstumskurve für die humanen cornealen Stromazellen dargestellt. Die Fibroblasten zeigten von den drei unterschiedlichen cornealen Zelltypen das geringste Wachstum unter den gewählten Kultivierungsbedingungen. Eine mögliche Ursache liegt in dem nativen Charakter der Zellen. Während die Fibroblasten mit einer Latenz-Phase von 1,5 Tagen ein schlechteres Adaptionsvermögen als die cornealen Endothelzellen aufwiesen, war die Populationsverdopplungszeit mit 1,8 Tagen nur etwas länger als bei den Endothelzellen mit 1,6 Tagen. Die Plateau-Phase wurde schon nach etwa 6 Tagen erreicht, was an der deutlich niedrigeren Sättigungsdichte von $4,7 \times 10^4$ Zellen/Well der nativen Fibroblasten im Vergleich zu den immortalisierten Endothel- und Epithelzellen liegt.

4.1.2.3 Wachstumsverhalten der cornealen Epithelzellen (CEPI)

Die humanen cornealen Epithelzellen der Zelllinie CEPI zeigten das beste Wachstum unter den gewählten Bedingungen (Abbildung 18). Nach einer Latenz-Phase von 1,1 Tagen zeigten die CEPI-Zellen im Vergleich zu den Endothelzellen und Fibroblasten eine stark verkürzte Populationsverdopplungszeit mit 0,9 Tagen und eine deutlich höhere Sättigungsdichte von $9,5 \times 10^5$ Zellen/Well. Die Plateau-Phase war nach etwa 10 Tagen erreicht. Der letzte aufgenommene Messwert nach 21 Tagen zeigte eine verminderte Zellzahl von etwa $4,7 \times 10^5$ Zellen/Well. Zu diesem Zeitpunkt befand sich die Kultur bereits in der Absterbephase, da nach Erreichen der Sättigungsdichte kein weiterer Platz für die Zellvermehrung zur Verfügung steht.

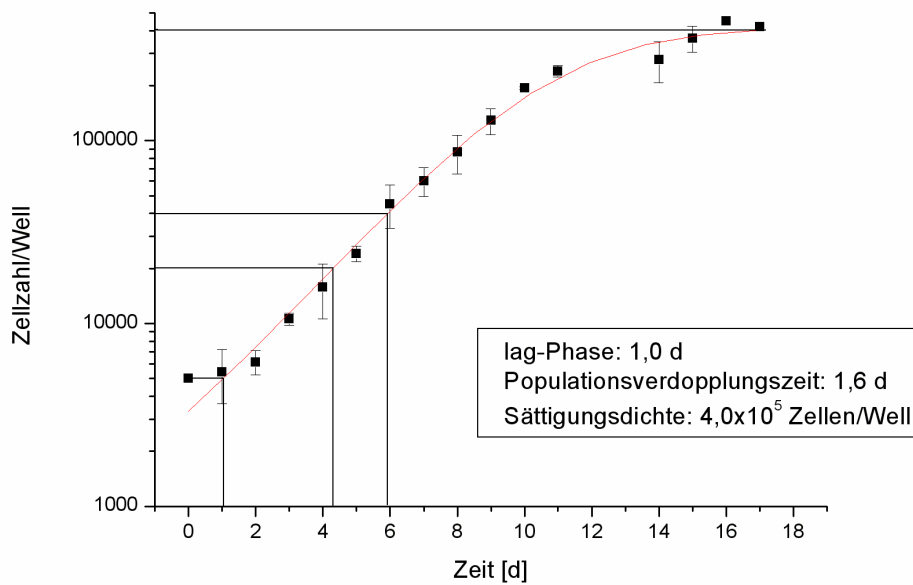


Abbildung 16 Wachstum der humanen cornealen Endothelzellen in F99-Wachstumsmedium, (n=5, bestimmt wurde die Zellzahl pro Well bei 24er Well-Platten mit einer Fläche von $2,01 \text{ cm}^2$ pro Well)

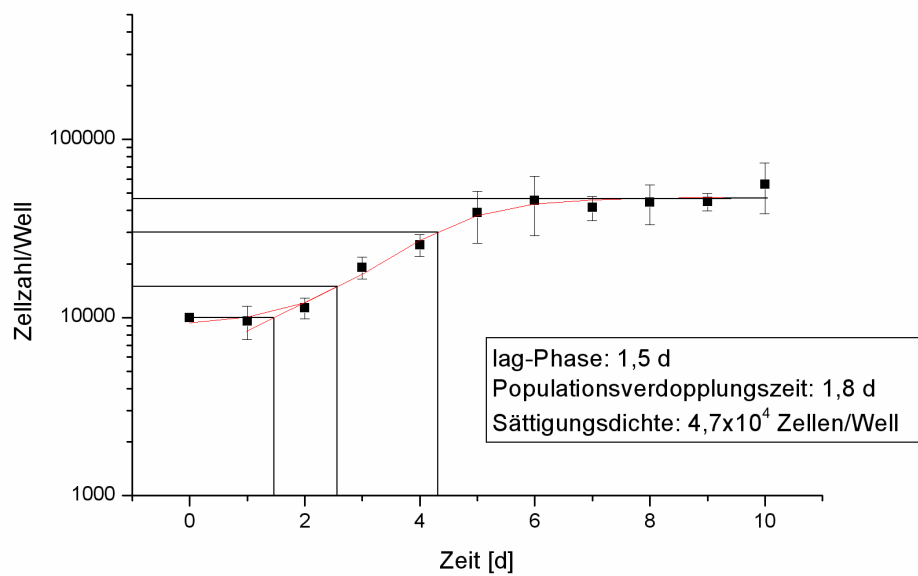


Abbildung 17 Wachstum der humanen cornealen Fibroblasten in Ready-Mix-Wachstumsmedium, (n=5, bestimmt wurde die Zellzahl pro Well bei 24er Well-Platten mit einer Fläche von $2,01 \text{ cm}^2$ pro Well)

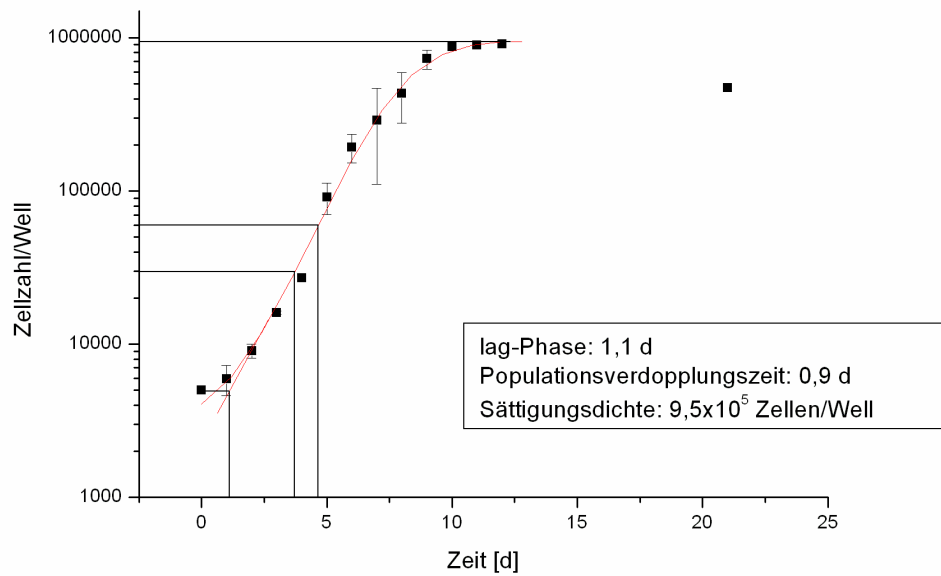


Abbildung 18 Wachstum der humanen cornealen Epithelzellen (CEPI) in DMEM/F12-Wachstumsmedium mit 5 % Serumanteil, (n=3, bestimmt wurde die Zellzahl pro Well bei 24er Well-Platten mit einer Fläche von $2,01 \text{ cm}^2$ pro Well)

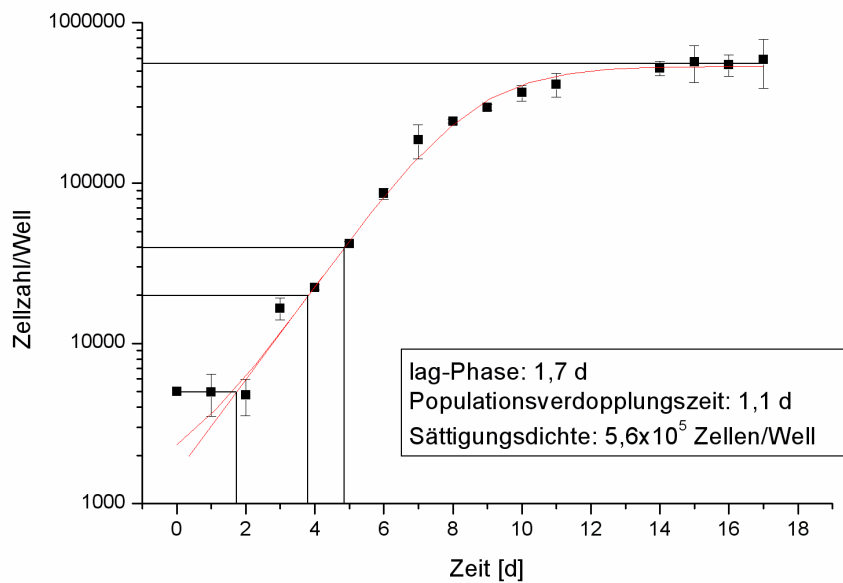


Abbildung 19 Wachstum der humanen cornealen Epithelzellen (HCE-T) in Sasaki-Wachstumsmedium, (n=3, bestimmt wurde die Zellzahl pro Well bei 24er Well-Platten mit einer Fläche von $2,01 \text{ cm}^2$ pro Well)

4.1.2.4 Wachstumsverhalten der cornealen Epithelzellen (HCE-T)

Die zweite humane corneale Epithelzelllinie HCE-T zeigt ein etwas schlechteres Wachstum unter den gewählten Bedingungen (Abbildung 19). Nach einer relativ langen Latenz-Phase von 1,7 Tagen zeigten die HCE-T-Zellen im Vergleich zu den CEPI-Zellen eine etwas größere Populationsverdopplungszeit mit 1,1 Tagen und eine deutlich geringere Sättigungsdichte von $5,6 \times 10^5$ Zellen/Well. Die Plateau-Phase war nach etwa 14 Tagen erreicht.

Tabelle 3 Zusammenfassung der ermittelten Wachstumsparameter für die Kultivierung der humanen cornealen Zellen in ihren speziellen Wachstumsmedien

	lag-Phase [Tage]	Populationsverdopplungszeit [Tage]	Sättigungsdichte [Zellen/Well]
Endothelzellen	1,0	1,6	$4,0 \cdot 10^5$
Fibroblasten	1,5	1,8	$0,47 \cdot 10^5$
Epithelzellen (CEPI)	1,1	0,9	$9,5 \cdot 10^5$
Epithelzellen (HCE-T)	1,7	1,1	$5,6 \cdot 10^5$

4.1.3 Zusammenfassende Diskussion zur Kultivierung und Charakterisierung der humanen cornealen Zelllinien

Die Endothelzelllinie HENC und die Epithelzelllinie CEPI sind bereits seit 8 Jahren in unserem Institut in Kultur und zeigten keine Veränderungen in ihrem morphologischen Erscheinungsbild. Bei den Fibroblasten, die regelmäßig aus scleralen Ringen isoliert wurden, waren keine morphologischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Chargen zu erkennen.

Als Alternative zu der humanen Epithelzelllinie CEPI wurde die ebenfalls immortalisierte humane Epithelzelllinie HCE-T neu in Kultur genommen, die das gleiche kopfsteinpflasterartige Aussehen aufwies. Ebenso erreichten beide Zelllinien eine hohe Sättigungsdichte in Kultur, wobei die höhere Sättigungsdichte bei der CEPI-Zelllinie vermutlich durch vereinzelte Zellcluster zustande kam, die trotz submerser Kulturbedingungen entstanden waren.

Die nativen Fibroblasten zeigten im Gegensatz zu den immortalisierten Zellen eine deutlich geringere Sättigungsdichte und wiesen auch die längste Populationsverdopplungszeit auf.

4.2 Aufbau des humanen Cornea-Konstrukts

Ziel der Entwicklung war es aus humanen cornealen Zellen in Anlehnung an die Untersuchungen von Reichl (2003) in vitro ein mehrschichtiges Cornea-Äquivalent aufzubauen. Des Weiteren sollte die Epithelzelllinie CEPI durch die Epithelzelllinie HCE-T ersetzt werden, die durch ihre Fähigkeit dichte tight junctions auszubilden ein gutes Modell für Permeationsuntersuchungen darstellt [Toropainen et al., 2001].

Dabei sollte die Eignung des Cornea-Konstrukts als Permeationsbarriere mit den beiden Epithelzelllinien für verschiedene Arzneistoffe gezeigt und mit humaner Cornea verglichen werden. Außerdem sollten Zytotoxizitätsuntersuchungen an den Cornea-Modellen durchgeführt werden, um zu prüfen, ob diese Cornea-Modelle als Tierversuch-Ersatz-Modelle etabliert werden können.

Reichl (2003) beschrieb eine Kultivierung der cornealen Zellen in Transwell-Membran-Einsätzen, die eine Versorgung der Konstrukte mit Medium von oben und unten ermöglichen. Außerdem kann das Konstrukt zur Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels an die Luft-Medium-Grenze gehoben werden. Da sich in der Arbeitsgruppe diese Art der Kultivierung sowohl mit cornealen Zellen bovinen [Tegtmeyer et al., 2001, 2004] und porcinen bzw. humanen [Reichl und Müller-Goymann, 2001, 2003; Reichl et al., 2004, 2005] Ursprungs, als auch mit dermalen humanen Zellen [Specht et al., 1998; Hoffmann und Müller-Goymann, 2005] zur Herstellung organotypischer Äquivalente bewährt hat, wurde diese Methode beibehalten und nur in wenigen Punkten modifiziert (s. Abschnitt 3.2.2).

4.2.1 Humanes Cornea-Konstrukt aus Endothelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen der Zelllinie CEPI

Als erster Schritt wurde ein dünnes azelluläres Kollagengel in den Transwell-Membran-Einsatz gegossen. Dieses sollte einerseits die Kulturen stabilisieren und andererseits als Substrat für die Endothelzellen dienen. Nach dem Gelieren des Bodengels wurden die Endothelzellen aufgesät. Sie zeigten eine rasche Anheftung und gutes Wachstum, so dass nach 7 Tagen ein konfluenter Monolayer beobachtet werden konnte [Reichl et al., 2004]. Als Stromaäquivalent wurde eine Biomatrix, die aus Kollagen Typ I aufgebaut war und humane corneale Fibroblasten enthielt, auf das Endothel aufgebracht. Die Eignung von Kollagengelen in der Kultivierung dreidimensionaler dermalen oder cornealer Gewebeäquivalente konnte in verschiedenen

Untersuchungen gezeigt werden [Specht et al., 1998; Hoffmann und Müller-Goymann, 2005; Tegtmeyer et al., 2001, 2004; Reichl und Müller-Goymann, 2001; Reichl et al., 2004]. Während der weiteren Kultivierung kam es in Abhängigkeit von der Kollagenkonzentration bzw. der eingebrachten Menge an Fibroblasten zu einer Kontraktion des Gels, wobei eine hohe Zellzahl bzw. eine geringere Proteinkonzentration die Kontraktion verstärkten [Bell et al., 1979]. Die Kontraktion der Biomatrix ist ein viel beobachtetes Phänomen, welches die Lebensfähigkeit der Fibroblasten in der Matrix zeigt. Die Fibroblasten versuchen sich in der Matrix zu bewegen und reorganisieren so die Kollagenfibrillen [Ehrlich und Rajaratnam 1990]. Alberts et al. (2004) nehmen an, dass Fibroblasten in einem Gel aus zufallsorientierten Kollagenfibrillen das Kollagen aus ihrer Umgebung zusammenziehen und richten, bis dieses nur noch einen Bruchteil seines ursprünglichen Volumens einnimmt. Ehrlich et al. (2000) konnten darüber hinaus zeigen, dass die Kommunikation zwischen den Fibroblasten über gap junctions die Kontraktion der Kollagenmatrix fördert. Neuere Untersuchungen von Garrett et al. (2004) konnten zeigen, dass eine Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten stimuliert durch den transforming growth factor β (TGF- β) mit der Kontraktion des Kollagengels einhergeht.

Die Kontraktion des Kollagengels konnte etwa 24 h nach dem Ablösen der Gele vom Rand des Transwells-Einsatzes beobachtet werden und erreichte ihren Höhepunkt etwa an Tag 4-5 der Kultivierung. Zu einer weiteren geringfügigen Kontraktion kam es nach Aufsäen und Kultivierung der Epithelzellen auf dem Gel. Diese stimulieren nach Mishima et al. (1998) und Daniels und Khaw (2000) durch Absonderung verschiedener Wachstumsfaktoren die Fibroblasten und führen so zu einer weiteren Kontraktion des Kollagengels.

Nach Aufsäen der humanen cornealen Epithelzellen (CEPI) kam es innerhalb von einer Woche zur Ausbildung eines konfluenten Monolayers der Zellen auf dem Stromaäquivalent. Durch Anhebung des Konstrukts an die Luft-Medium-Grenze bildete sich daraus ein mehrschichtiges Epithel. In Abbildung 20 ist der Querschnitt des mehrschichtigen CEPI-Epithels des humanen Cornea-Konstrukts zu sehen. Man erkennt mehrere Zelllagen an Epithelzellen auf der Biomatrix, wobei die Dicke des Epithels und die Anzahl der Schichten gut mit dem humanen Originalgewebe (Abbildung 21) korreliert. Allerdings ist die Oberfläche des Konstrukts im Vergleich zur humanen Cornea deutlich unregelmäßiger und weist stellenweise sehr viel mehr

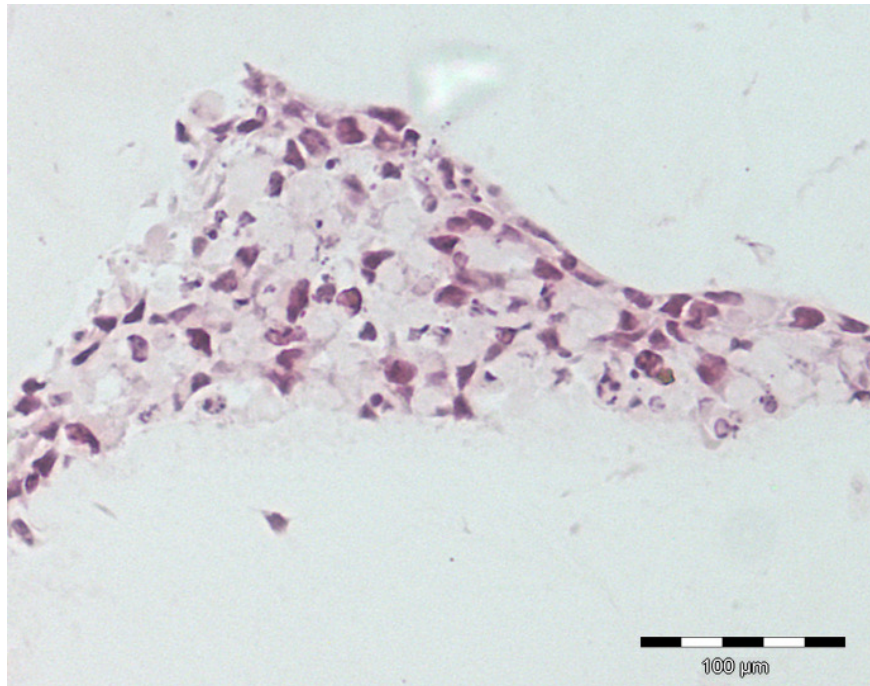


Abbildung 20: Querschnitt des oberen Teils des humanen Cornea-Konstrukts mit CEPI-Epithel, H&E-Färbung, Balkenlänge entspricht 100 μm

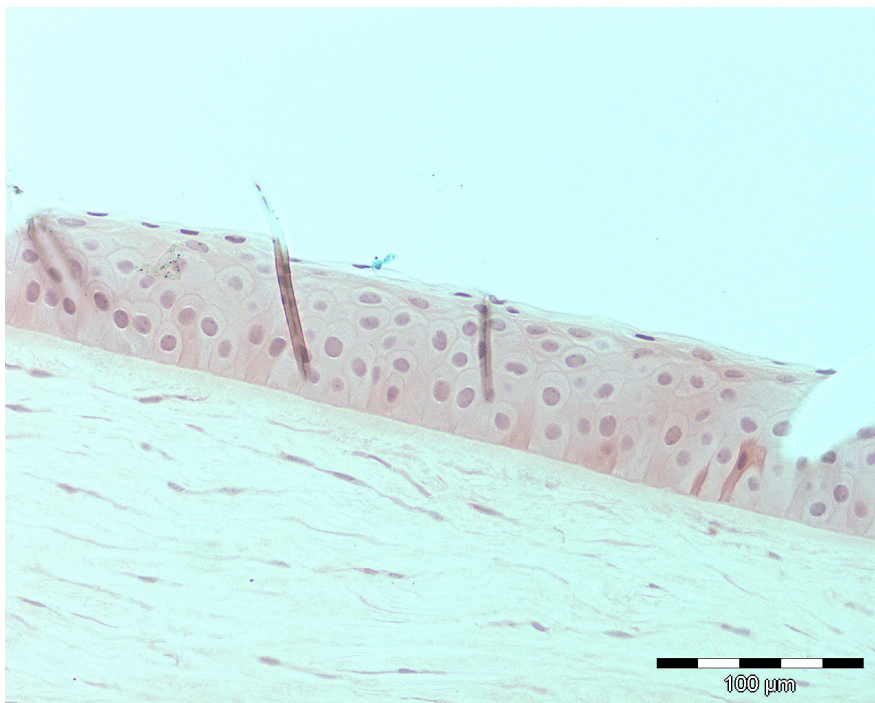


Abbildung 21: Querschnitt des oberen Teils einer humanen Cornea, H&E-Färbung, Balkenlänge entspricht 100 μm

Zelllagen auf. Die Ursache dafür liegt im fehlenden Lidschlag, der am Auge für das Abschliffen der obersten Zellschichten verantwortlich ist. Des Weiteren ist sowohl beim Originalgewebe als auch beim Konstrukt eine Abflachung der Oberflächenzellen zu erkennen. Diese morphologischen Gemeinsamkeiten zwischen den humanen Cornea-Modellen und dem Originalgewebe konnten bereits Reichl et al. (2004) in einer vorhergehenden Arbeit zeigen. Die Methoden zur Herstellung und Kultivierung der humanen Cornea-Konstrukte führten also zu gut reproduzierbaren In-vitro-Modellen mit einer starken Annäherung an die In-vivo-Situation.

4.2.2 Humanes Cornea-Konstrukt aus Endothelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen der Zelllinie HCE-T

Es sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob die Epithelzelllinie CEPI durch die Epithelzelllinie HCE-T ersetzt werden kann. Die Vorteile der HCE-T-Zellen liegen in ihrer Fähigkeit dichte tight junctions auszubilden, in der guten Verfügbarkeit und der umfangreichen Charakterisierung in der Literatur [Araki-Sasaki et. al. 1995; Toropainen et al., 2001; Becker et. al. 2007].

Die HCE-T-Zellen wurden in der gleichen Menge auf das kontrahierte Kollagengel aufgesät und ebenfalls für die Dauer von 7 Tagen submers und anschließend 10 weitere Tage an der Luft-Medium-Grenze kultiviert. Ein Unterschied bestand lediglich im Kultivierungsmedium. Die Konstrukte wurden von der Aufsaat der Epithelzellen an mit Sasaki-Medium, dem Standard-Medium der HCE-T-Zellen, kultiviert. Dabei war zu beobachten, dass sich im Gegensatz zu den Konstrukten mit CEPI-Epithel die Kollagenmatrix nicht weiter zusammenzog. Der mittlere Durchmesser der Konstrukte mit HCE-T-Epithel nach Ende der fünföchigen Kultivierungsdauer war mit $11,3 \text{ mm} \pm 1,5 \text{ mm}$ deutlich größer als bei den Konstrukten mit CEPI-Epithel mit $7,8 \text{ mm} \pm 1,4 \text{ mm}$. Die Konstrukte mit HCE-T-Epithel waren nicht nur größer, sondern das Kollagengel zeigte aufgrund der schlechteren Kontraktion auch eine geringere Festigkeit. Für einige Permeations- und Zytotoxizitätsversuche (s.Abschnitt 4.3.2 und 4.5.2.5) wurde daher das Wachstumsmedium der CEPI-Zellen zur Kultivierung der Konstrukte mit HCE-T-Epithel verwendet. Der mittlere Durchmesser dieser Konstrukte war nach Ende der fünföchigen Kultivierungsdauer $9,7 \text{ mm} \pm 1,1 \text{ mm}$, und das Konstrukt zeigte eine etwas festere Struktur.

In Abbildung 22 ist der Querschnitt durch das Konstrukt mit HCE-T-Epithel zu sehen.

Die HCE-T-Zellen bilden genau wie die CEPI-Zellen einen konfluenten Monolayer aus, der an der Luft-Medium-Grenze zu einem mehrschichtigen Epithel auswächst. Auch bei diesem Modell sind die strukturellen Ähnlichkeiten zur Morphologie des Originals gut erkennbar. Die Oberfläche ist durch die fehlende mechanische Beanspruchung des Lidschlages ebenfalls unregelmäßig.

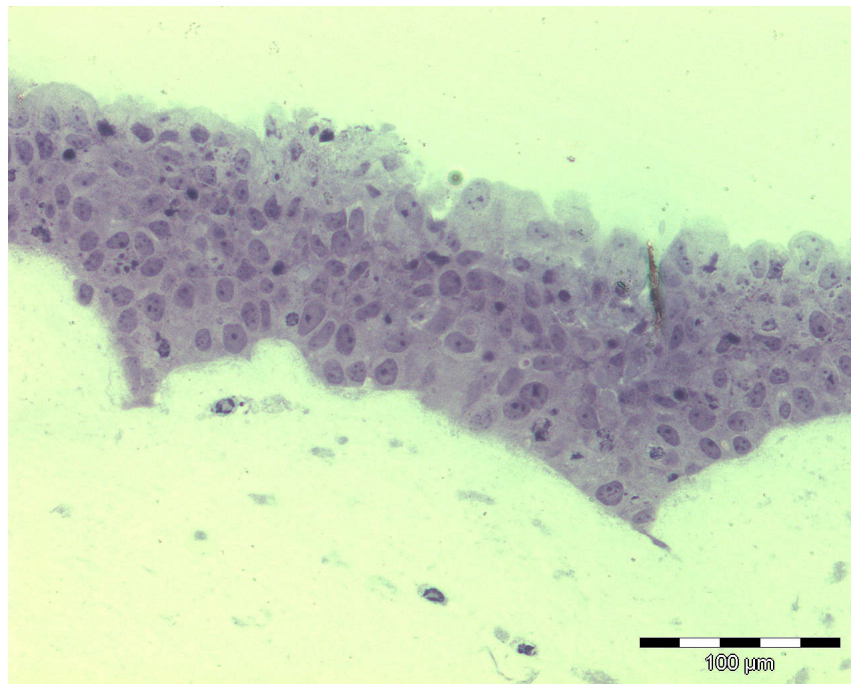


Abbildung 22: Querschnitt des oberen Teils des humanen Cornea-Konstrukts mit HCE-T-Epithel, H&E-Färbung, Balkenlänge entspricht 100 μm

4.2.3 Zusammenfassende Diskussion zum Aufbau der Cornea-Konstrukte

Die von Reichl et al. (2004) entwickelte Methode zum schrittweisen Aufbau eines humanen Cornea-Konstrukts unter Verwendung eines fibroblastenhaltigen Kollagengels als Stromamatrix, führte zu einer ähnlichen Struktur, wie bei der exzidierten humanen Hornhaut. Die Querschnitte durch die Epithelschichten der beiden Cornea-Konstrukt-Typen mit CEPI- und HCE-T-Epithel zeigen viele histologische Gemeinsamkeiten mit dem Epithel der humanen Cornea in vivo. Es ist deutlich zu erkennen, dass beide immortalisierten Epithelzelllinien zur Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels in der Lage sind.

Im Vergleich zum Originalgewebe in Abbildung 21 geht allerdings die klare Strukturierung in Basal-, Flügel- und Oberflächenzellen etwas verloren, und die Zellschichten sind unregelmäßig angeordnet. Bei den beiden eingesetzten

Epithelzelllinien handelte es sich um immortalisierte Zellen, die mit SV 40-Viren in vitro infiziert wurden. Durch diese Behandlung entsteht ein so genannter transformierter Phänotyp, der sich in einem unbegrenzten Zellteilungsvermögen, verstärkten Wachstumsraten, aber auch in einem veränderten und verringerten Differenzierungspotential äußert [Freshney, 2005; Schmitz, 2007].

Ein weiterer Unterschied im morphologischen Erscheinungsbild des Epithels war die unregelmäßige Oberfläche der Konstrukt-Epithelien im Vergleich zur glatten, gleichmäßigen Oberfläche der humanen Cornea. In vivo liegt auf der Hornhaut ein Tränenfilm, der zusammen mit dem Lidschlag wie eine „Scheibenwaschanlage“ im Auto funktioniert [Leydhecker, 1990]. Unter diesen Bedingungen werden die oberen Zellen als Folge des Lidschlags und des Tränenflusses kontinuierlich abgeschilfert.

Die Cornea-Konstrukte mit HCE-T-Epithel hatten nach Ende der Kultivierungszeit einen größeren Durchmesser und eine geringere Konsistenz als die Konstrukte mit CEPI-Epithel. Der Grund für die schlechtere Kontraktion war das Sasaki-Medium, ein 1:1 Gemisch von DMEM und Ham's F12 mit Zusätzen von fetalem Kälberserum, Insulin, epidermalem Wachstumsfaktor, DMSO und Choleratoxin. Der Zusatz von Choleratoxin bewirkt eine Wachstumsförderung von Epithelzellen bei gleichzeitiger Wachstumshemmung von Fibroblasten durch Erhöhung der intrazellulären Konzentration von cyclischem AMP [Taylor-Papadimitiou et al., 1980]. Durch die Hemmung der Fibroblasten konnten diese die Kollagenmatrix nicht mehr ausreichend kontrahieren und die Struktur war weniger fest. Die Kultivierung der Cornea-Konstrukte mit HCE-T-Epithel im Wachstumsmedium der Epithelzelllinie CEPI führte zu einer stärkeren Kontraktion der Kollagenmatrix, wobei der geringe Durchmesser sowie die Festigkeit der Konstrukte mit CEPI-Epithel trotzdem nicht ganz erreicht werden konnten. Ein möglicher Grund für die schwächere Kontraktion ist eine geringere Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie dem platelet-derived growth factor (PDGF) oder dem transforming growth factor (TGF- β), die für die Umwandlung der Fibroblasten in Myofibroblasten verantwortlich sind [Daniels und Khaw, 2000; Garrett et al., 2004]. Diese Wachstumsfaktoren werden unter anderem mittels parakriner Sekretion von den Epithelzellen in die extrazelluläre Matrix abgegeben und sind so Bestandteil der Zell-Zell-Kommunikation [Cox, 1995]. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beiden unterschiedlichen Epithelzelllinien sich in ihrem Kommunikationsverhalten unterscheiden und die Umwandlung der Fibroblasten verschieden stark beeinflussen.

4.3 Permeationsuntersuchungen

Ein Ziel der Arbeit war es, das von Reichl et al. (2004) entwickelte organotypische humane Cornea-Konstrukt als In-vitro-Modell für Permeationsuntersuchungen an verschiedenen Arzneistoffen zu testen und mit der Permeation durch humane Spenderhornhäute zu vergleichen.

Die Vorteile der Cornea-Konstrukte ergeben sich aus den vielzähligen Nachteilen der humanen Spenderhornhäute. Diese sind zum einen nur in geringem Umfang verfügbar, da die meisten zu Transplantationszwecken eingesetzt werden, zum anderen gibt es dabei auch deutliche Unterschiede in der Beschaffenheit. So haben die Todesursache, sowie die Zeitspanne zwischen Todeszeitpunkt und Entnahme der Cornea einen deutlichen Einfluss auf die Qualität der Cornea [Redbrake et al., 1994]. Dies kann durch standardisierte Kultivierung der Cornea-Konstrukte mit homogenem Zellmaterial bei In-vitro-Tests vermieden werden.

Der überwiegende Teil der In-vitro-Permeationsversuche in der Arzneimittelforschung wird an isolierten Hornhäuten von Versuchstieren, und hier insbesondere von Kaninchen, durchgeführt [Prausnitz und Noonan, 1998]. Dabei stellt sich die Frage, inwiefern die am Tier gewonnenen Daten auf den Menschen übertragen werden können [Lee und Robinson, 1986]. Darüber hinaus spielt der Tierschutzgedanke eine wichtige Rolle, so dass mit Zellkultur-Modellen der Cornea ein wichtiger Beitrag im Sinne des Tierschutzes geleistet werden kann.

Um die Eignung organotypischer Konstrukte als In-vitro-Modelle zu testen, erscheint es sinnvoll, das Permeationsvermögen von Stoffen durch diese Kulturen zu bestimmen und mit der Permeation durch exzidiertes Gewebe zu vergleichen. Zu diesem Zweck werden in der Literatur häufig Mannitol, Fluorescein und Rhodamin B als hydrophile bzw. lipophile Modellsubstanzen verwendet [Kawazu et al., 1998; Chang et al., 2000; Toropainen et al., 2001]. Praxisnäher erscheint allerdings die Untersuchung des Cornea-Konstrukts als In-vitro-Permeationsmodell mit ophthalmologischen Wirkstoffen. Aus diesem Grund wurden die Permeationsuntersuchungen mit Timolol-HM, Diclofenac-Na und Clindamycin-HCl als Modellarzneistoffen durchgeführt, wobei darauf geachtet wurde, dass mit Timolol-HM und Diclofenac-Na analog zu Mannitol und Rhodamin B sowohl ein eher hydrophiler als auch ein eher lipophiler Arzneistoff verwendet wurde. Der logarithmierte Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient $\log P_{\text{oct/wasser}}$ (Abschnitt 3.2.6.2) beträgt für Timolol-HM -3 und für Diclofenac-Na 1,5 in den entsprechenden wässrigen Formulierungen.

Clindamycin-HCl nimmt mit einem $\log P_{\text{oct/wasser}}$ Wert von -0,09 eher eine Mittelstellung ein.

4.3.1 Vergleichende Permeationsuntersuchungen durch humane Cornea-Konstrukte mit CEPI-Epithel und humane Spenderhornhaut

Nachdem Reichl et al. (2004) bereits die Eignung der humanen Cornea-Konstrukte für Permeationsuntersuchungen anhand der Arzneistoffe Pilocarpin, Hydrocortison und Befunolol-Hydrochlorid zeigen konnten, sollte ein Vergleich der Barriereigenschaften der Cornea-Konstrukte mit denen exzidiierter humaner Cornea für weitere Arzneistoffe erfolgen um die Qualität der Permeationsbarriere der Cornea-Konstrukte beurteilen zu können. In vorangegangenen Untersuchungen wurden nur Vergleiche zu exzidierten Corneae von anderen Spezies, wie Rind oder Schwein angestellt, die sich jedoch in Dicke und Durchlässigkeit nicht nur von der humanen Cornea, sondern auch untereinander sehr stark unterscheiden [Tegtmeyer, 2000].

Zur Untersuchung der Permeationseigenschaften von humanen Cornea-Konstrukten mit CEPI-Epithel im direkten Vergleich zu exzidiierter humaner Cornea wurden die 0,5%igen, wässrigen Lösungen der Arzneistoffe Timolol-HM, Diclofenac-Na und Clindamycin-HCl verwendet.

4.3.1.1 Permeation von Timolol-HM

In Abbildung 23 sind die permeierten Wirkstoffmengen einer wässrigen Timolol-HM-Lösung 0,5 % für die beiden Permeationsbarrieren gezeigt. Man sieht sehr gut, dass die Verläufe der beiden Kurven eine nahezu identische Steigung aufweisen. Lediglich der erste Messpunkt nach 60 min ist unterschiedlich. Während bei der Cornea der Wirkstoff sofort permeiert, scheint er sich im Konstrukt erst anzureichern. Die errechneten Permeationskoeffizienten sind in Tabelle 4 gegenübergestellt. Das humane Cornea-Konstrukt zeigt gegenüber der exzidierten humanen Cornea nahezu keinen Unterschied. Der Faktor 1,0 deutet auf identische Barriereigenschaften von humanem Cornea-Konstrukt und exzidiierter humaner Cornea hin. Ebenfalls interessant ist der Vergleich mit der Permeation von Timolol durch Kaninchencornea, welche schon vielfach untersucht wurde. Bei diesen Untersuchungen variieren die ermittelten Permeationskoeffizienten zwischen $8,0 \cdot 10^{-6}$ und $1,8 \cdot 10^{-5}$ cm/s [Ahmed et

al. 1987, Huang et al. 1983, Chang et al. 1987]. Die Permeationskoeffizienten für die exzidierte humane Cornea und das humane Cornea-Konstrukt liegen am unteren Ende dieses Bereiches. Diese Ergebnisse korrelieren gut mit der Tatsache, dass die Kaninchencornea mit 372 bis 407 μm etwas dünner ist als die Cornea des Menschen mit 500 bis 700 μm [T. Chan et al. 1983].

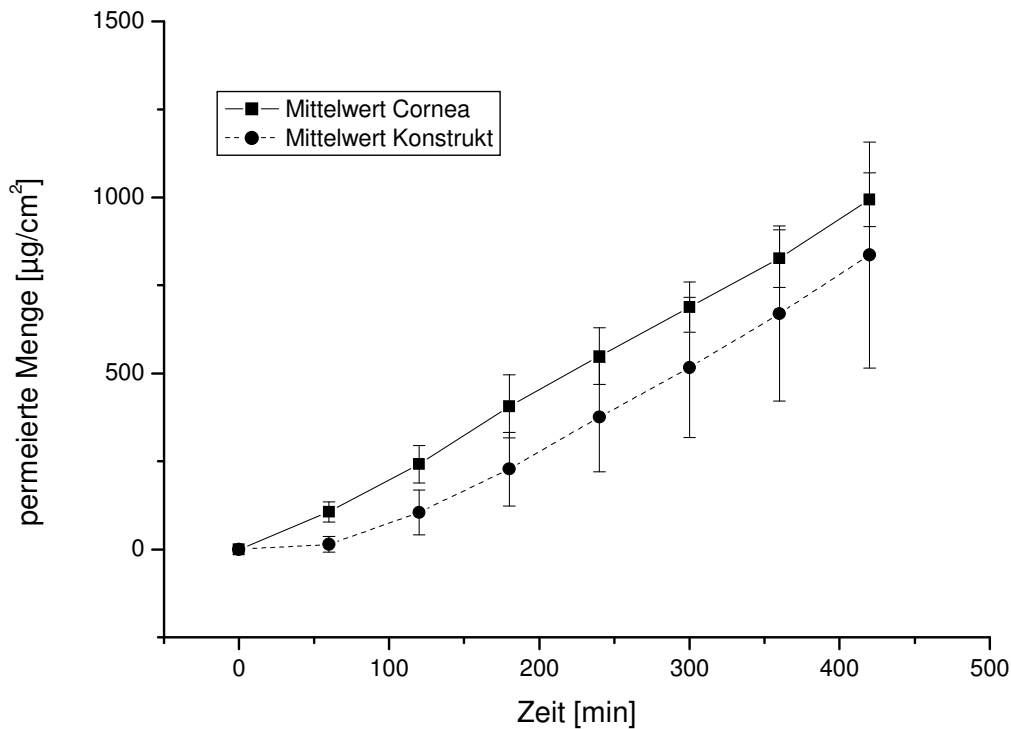


Abbildung 23 Permeation von Timolol-HM durch das humane Cornea-Konstrukt (n=10) und die exzidierte humane Cornea (n=8); ★ kennzeichnet Signifikanzen von $p < 0,05$

Tabelle 4 Vergleich von Arzneistoffflux und Permeationskoeffizient für die Permeation von Timolol-HM durch das humane Cornea-Konstrukt (n=10) und die exzidierte humane Cornea (n=8)

	Flux J [g/cm ² ·s]	Permeationskoeffizient P [cm/s]
humanes Cornea-Konstrukt	$4,01 \cdot 10^{-8} \pm 1,28 \cdot 10^{-8}$	$8,02 \cdot 10^{-6} \pm 2,56 \cdot 10^{-6}$
Exzidierte humane Cornea	$4,20 \cdot 10^{-8} \pm 0,41 \cdot 10^{-8}$	$8,40 \cdot 10^{-6} \pm 0,82 \cdot 10^{-6}$
Faktor	1,0	

Die Standardabweichung bei den Zellkulturmodellen ist entgegen früheren Untersuchungen deutlich größer als die bei den humanen Corneae. Die exzidierten Hornhäute wurden in den Hornhautbanken für eine gewisse Zeit unter standardisierten Bedingungen kultiviert, wodurch ein Auftreten von interindividuellen Unterschieden möglicherweise verhindert wurde.

4.3.1.2 Permeation von Diclofenac-Na

Zur weiteren Untersuchung der Barriereigenschaften von Cornea-Konstrukt und exzidierte humaner Cornea wurde als zweiter Arzneistoff Diclofenac-Na ausgewählt, der bei entzündlichen Erkrankungen des Auges zum Einsatz kommt. Es wurde ebenfalls mit einer wässrigen, mit Natriumchlorid isotonisierten und sterilfiltrierten 0,5%igen Lösung gearbeitet.

In der graphischen Darstellung der Permeation von Diclofenac-Na (Abbildung 24) und auch im Vergleich der Permeationskoeffizienten (Tabelle 5) sind keine signifikanten ($p > 0,05$) Unterschiede im Permeationsverhalten des Arzneistoffs durch das In-Vitro-Modell der Cornea und die humane Cornea zu erkennen. Die Kurven verlaufen nahezu deckungsgleich.

Die Standardabweichung ist auch in diesem Beispiel für die exzidierte Cornea niedriger als für das Cornea-Modell, was für eine gute Qualität der humanen Cornea spricht und die Theorie untermauert, dass sich die interindividuellen Schwankungen durch die standardisierte Kultur in der Hornhautbank über einen längeren Zeitraum relativieren.

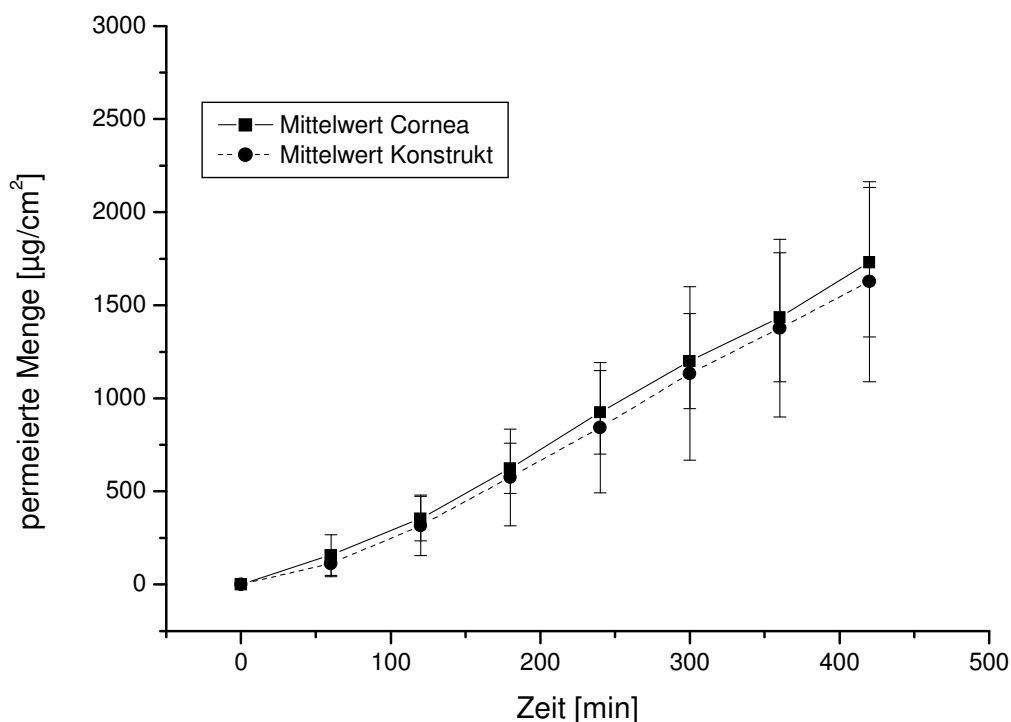


Abbildung 24 Permeation von Diclofenac-Na durch das humane Cornea-Konstrukt ($n=10$) und die exzidierte humane Cornea ($n=8$); ★ kennzeichnet Signifikanzen von $p < 0,05$

Tabelle 5 Vergleich von Arzneistoffflux und Permeationskoeffizient für die Permeation von Diclofenac-Na durch das humane Cornea-Konstrukt (n=10) und die exzidierte humane Cornea (n=8)

	Flux J [g/cm ² ·s]	Permeationskoeffizient P [cm/s]
humanes Cornea-Konstrukt	$7,32 \cdot 10^{-8} \pm 2,11 \cdot 10^{-8}$	$14,63 \cdot 10^{-6} \pm 4,21 \cdot 10^{-6}$
exzidierte humane Cornea	$7,42 \cdot 10^{-8} \pm 1,25 \cdot 10^{-8}$	$14,85 \cdot 10^{-6} \pm 2,49 \cdot 10^{-6}$
Faktor	1,0	

4.3.1.3 Permeation von Clindamycin-HCl

Als dritter Arzneistoff wurde das Clindamycin-HCl ausgewählt. Auch hier sieht man einen ähnlichen Verlauf der Permeationsgraphen (Abbildung 25).

Die Permeationskoeffizienten (Tabelle 6) unterscheiden sich nur geringfügig, die Permeabilität des humanen Cornea-Konstrukts ist um den Faktor 0,9 niedriger als die Permeabilität der humanen Cornea. Man kann also auch in diesem Fall von nahezu identischen Barriereigenschaften sprechen.

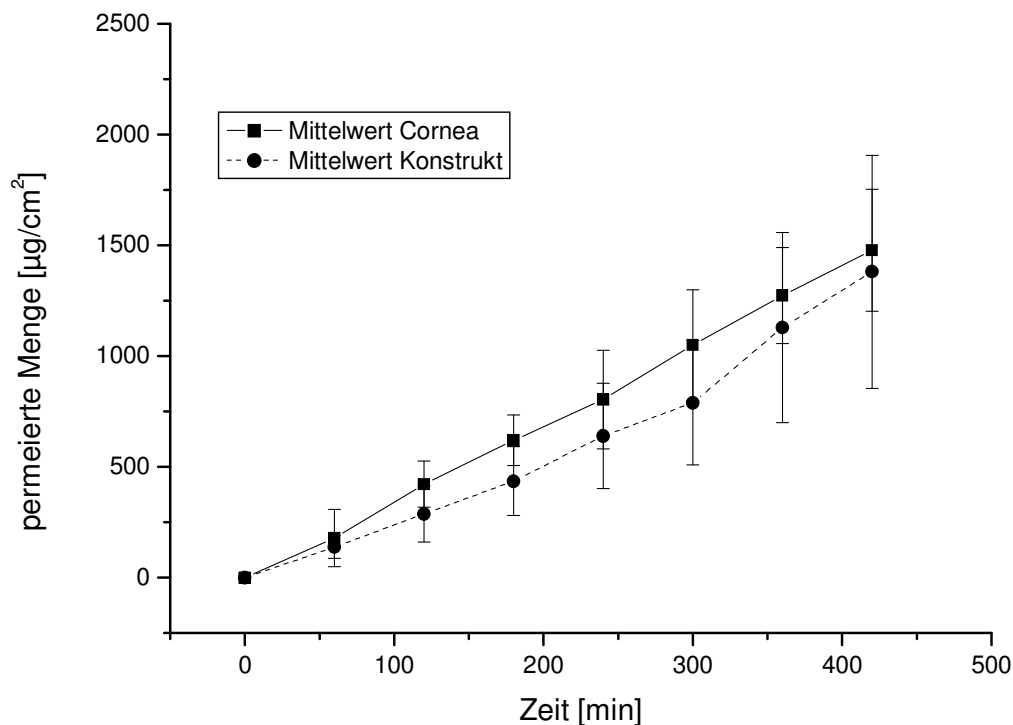


Abbildung 25 Permeation von Clindamycin-HCl durch das humane Cornea-Konstrukt (n=10) und die exzidierte humane Cornea (n=5); ★ kennzeichnet Signifikanzen von $p < 0,05$

Tabelle 6 Vergleich von Arzneistoffflux und Permeationskoeffizient für die Permeation von Clindamycin-HCl durch das humane Cornea-Konstrukt (n=10) und die exzidierte humane Cornea (n=5)

	Flux J [g/cm ² ·s]	Permeationskoeffizient P [cm/s]
humanes Cornea-Konstrukt	$5,42 \cdot 10^{-8} \pm 2,41 \cdot 10^{-8}$	$10,84 \cdot 10^{-6} \pm 4,81 \cdot 10^{-6}$
exzidierte humane Cornea	$5,94 \cdot 10^{-8} \pm 0,98 \cdot 10^{-8}$	$11,87 \cdot 10^{-6} \pm 1,97 \cdot 10^{-6}$
Faktor	0,9	

4.3.1.4 Zusammenfassende Diskussion zu den Permeationsuntersuchungen durch das humane Cornea-Konstrukt mit CEPI-Epithel und exzidierte humane Cornea im Vergleich

Die Ergebnisse der Permeationsuntersuchungen zeigen, dass das Ausmaß und die Geschwindigkeit, mit der die verschiedenen Arzneistoffe im Akzeptorkompartiment erscheinen, für beide Permeationsbarrieren nahezu identisch sind. Die Faktoren 0,9-1 beim Vergleich der Permeationskoeffizienten für die wässrigen Lösungen deuten auf eine sehr gute Annäherung der Barriereigenschaften des Konstrukts mit CEPI-Epithel an die der humanen Cornea hin. Eine ebenso gute Korrelation der Ergebnisse zeigte sich schon in früheren Untersuchungen mit Pilocarpin-HCl, Befunolol-HCl und Hydrocortison zwischen exzidierter humaner Cornea und Cornea-Konstrukten mit CEPI-Epithel [Reichl et al., 2005]. Bei vergleichenden Permeationsuntersuchungen mit einem bovinen bzw. porcinen Cornea-Konstrukt und entsprechender exzidierter Cornea wurde hingegen für verschiedene arzneistoffhaltige Zubereitungen eine um die Faktoren 2-4 erhöhte Permeabilität der Cornea-Konstrukte gezeigt [Tegtmeyer et al., 2001; Reichl und Müller-Goymann, 2001]. Im Vergleich dazu ist die Permeationsbarriere von reinen cornealen Epithelzellkulturen um ein Vielfaches schlechter als die des Originalgewebes. Kawazu et al. (1998) beschrieben eine um bis zu Faktor 37 erhöhte Permeabilität für verschiedene β -Blocker durch kultivierte corneale Epithelzellen des Kaninchens im Vergleich zur Kaninchencornea, während Goskonda et al. (2000) sogar eine um den Faktor 50-100 erhöhte Permeabilität von Phenylephrinhydrochlorid durch transformierte corneale Epithelzellkulturen des Kaninchens (SIRC) gegenüber der exzidierten Cornea fanden. Ein weiteres Modell aus Kaninchenzellen wurde von Chang et al. (1987) entwickelt. Sie konnten zeigen, dass eine Kultivierung an der

Luft-Medium-Grenze eine deutlich niedrigere Permeabilität für Mannitol ergab, als es in dem Modell von Kawazu et al. (1998) der Fall war. Eine identische Permeabilität von Timolol durch ein Kaninchenepithelmodell und exzidierte Kaninchencornea wurde von Burgalassi et al. (2004) gefunden. Allerdings wurden die Permeationsdaten mit unterschiedlichen Wirkstoff-Konzentrationen und Apparaturen bestimmt, wodurch gewisse Unterschiede innerhalb der Methode entstehen.

Die Ergebnisse der Permeationen durch humane corneale In-vitro-Modelle kommen den Verhältnissen in vivo deutlich näher. So fanden Toropainen et al. (2001) bei vergleichenden Permeationsuntersuchungen mit exzidierter Kaninchencornea eine „nur“ um den Faktor 3,7 erhöhte Permeation ihres Modells für die sehr hydrophile Verbindung ^3H -Mannitol und eine um den Faktor 1,2 erhöhte Permeabilität für die sehr lipophile Substanz Rhodamin B. Das Toropainen-Modell besteht dabei lediglich aus einem mehrschichtigen humanen Corneaepithel, kultiviert auf einem Kollagengel mit kokultivierten Fibroblasten, ohne corneale Endothelzellen. Den positiven Effekt einer endothelialen Schicht auf die Permeationsbarriere konnte Reichl (2003) bereits zeigen.

4.3.2 Permeationsuntersuchungen durch humane Cornea-Konstrukte mit HCE-T-Epithel

Im Verlauf dieser Arbeit wurde das Epithel der Cornea-Konstrukte abgewandelt, indem die epitheliale Zelllinie CEPI durch die HCE-T-Zelllinie ersetzt wurde. Diese Zellen sind bei einer Zellkulturbank erhältlich und sehr gut charakterisiert. Ihr Vermögen dichte tight junctions auszubilden [Toropainen et al. 2001] sollte genutzt werden, um Konstrukte mit genauso guten Barriereigenschaften wie mit CEPI-Epithel zu erhalten.

Ein Problem bei der Permeation durch Cornea-Konstrukte mit HCE-T-Epithel war die zum Teil unzureichende Qualität der Konstrukte im Hinblick auf ihre mechanische Festigkeit. Die Kollagenmatrices zogen sich im Verlauf der Kultivierung nicht so stark zusammen wie bei den Konstrukten mit CEPI-Epithel. Die relativ dünnen und weichen Konstrukte waren für die Permeationsuntersuchungen nur bedingt brauchbar, da sie zum Teil sehr weit in den Donator der Franz-Zelle eindrangen, die Diffusionsstrecke länger und die permeierte Arzneistoffkonzentration im Akzeptor geringer wurde. Zum Teil kollabierten die Konstrukte auch im Verlauf der Permeation,

was sich in sprunghaften Anstiegen der Arzneistoffkonzentration im Akzeptor zeigte. Aus diesem Grund wurden die Permeationen zusätzlich an Konstrukten durchgeführt, die zwar das HCE-T-Epithel besaßen, aber in DMEM/F12, dem eigentlichen CEPI-Medium kultiviert wurden, was keinen negativen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Fibroblasten hat. Diese Konstrukte hatten einen kleineren Durchmesser und waren etwas fester als die HCE-T-Epithel-Konstrukte, die mit Sasaki-Medium kultiviert wurden (s. Abschnitt 4.2.2). Allerdings waren sie immer noch größer als die ursprünglichen CEPI-Epithel-Konstrukte.

Die Permeationen wurden analog zu den vorangegangenen Untersuchungen mit wässrigen, isotonisierten und sterilfiltrierten Lösungen der Arzneistoffe durchgeführt, um eine direkte Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

4.3.2.1 Permeation von Timolol-HM

Bei der Permeation von wässriger Timolol-HM-Lösung (0,5 %) durch die Cornea-Konstrukte mit unterschiedlichen Epithelien fällt auf, dass die Konstrukte mit dem HCE-T-Epithel eine größere Barriere für das Timolol darstellen als die Modelle mit CEPI-Epithel (Abbildung 26). Die errechneten Permeationskoeffizienten sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Die Permeabilität ist um den Faktor 0,4 geringer als die des Konstrukts mit CEPI-Epithel, die der Permeabilität der exzidierten Cornea entspricht. Die Unterschiede zwischen den Konstrukten mit HCE-T-Epithel und den Konstrukten mit CEPI-Epithel sind signifikant ($p < 0,05$). Durch die Veränderung des Epithels kommt es also zu einer besseren Barrierefunktion, aber auch zu einer weniger guten Übereinstimmung mit dem Originalgewebe.

Die Permeationsdaten der Konstrukte, die in CEPI-Wachstumsmedium kultiviert wurden, unterscheiden sich nicht von denen der HCE-T-Konstrukte, die in Sasaki-Medium kultiviert wurden (Abbildung 26). Es ist nur zu erkennen, dass die Standardabweichung der in DMEM/F12 kultivierten Konstrukte deutlich geringer ist. Der Permeationskoeffizient ist nahezu identisch (Tabelle 7).

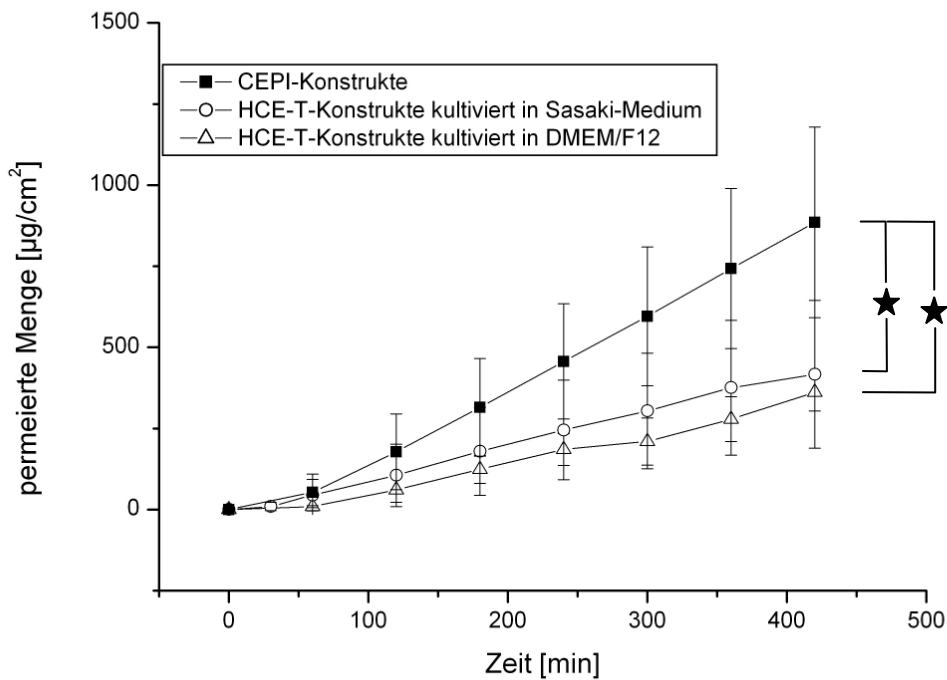


Abbildung 26 Permeation von Timolol-HM durch das humane Cornea-Konstrukt mit CEPI-Epithel (n=10), mit HCE-T-Epithel kultiviert in Sasaki-Medium (n=6) und mit HCE-T-Epithel kultiviert in DMEM/F12-Medium (n=4); ★ kennzeichnet Signifikanzen von $p < 0,05$

Tabelle 7 Vergleich von Arzneistoffflux und Permeationskoeffizient für die Permeation von Timolol-HM durch Cornea-Konstrukte mit CEPI-Epithel (n=10), mit HCE-T-Epithel kultiviert in Sasaki-Medium (n=6) und in DMEM/F12-Medium (n=4)

	Flux J [g/cm ² ·s]	Permeationskoeffizient P [cm/s]
HCE-T-Epithel (Sasaki-Medium)	$1,75 \cdot 10^{-8} \pm 0,74 \cdot 10^{-8}$	$3,50 \cdot 10^{-6} \pm 1,47 \cdot 10^{-6}$
HCE-T-Epithel (DMEM/F12)	$1,56 \cdot 10^{-8} \pm 0,33 \cdot 10^{-8}$	$3,13 \cdot 10^{-6} \pm 0,65 \cdot 10^{-6}$
CEPI-Epithel	$4,01 \cdot 10^{-8} \pm 1,28 \cdot 10^{-8}$	$8,02 \cdot 10^{-6} \pm 2,56 \cdot 10^{-6}$
Faktor (HCE-T/CEPI)	0,4 (Sasaki)/0,4 (DMEM/F12)	

4.3.2.2 Permeation von Diclofenac-Na

Die Permeation mit Diclofenac-Na sollte zeigen, wie sich die Permeationsbarriere der Cornea-Konstrukte mit HCE-T-Epithel für diesen lipophilen Arzneistoff im Vergleich zu den Konstrukten mit CEPI-Epithel verhält. Die Permeationsgraphen (Abbildung 27) zeigen, dass die Konstrukte mit dem HCE-T-Epithel, kultiviert in Sasaki-Medium, etwas durchlässiger für Diclofenac-Na sind. Der Unterschied zwischen den Permeationskoeffizienten ist allerdings nicht signifikant ($p > 0,05$) (Tabelle 8).

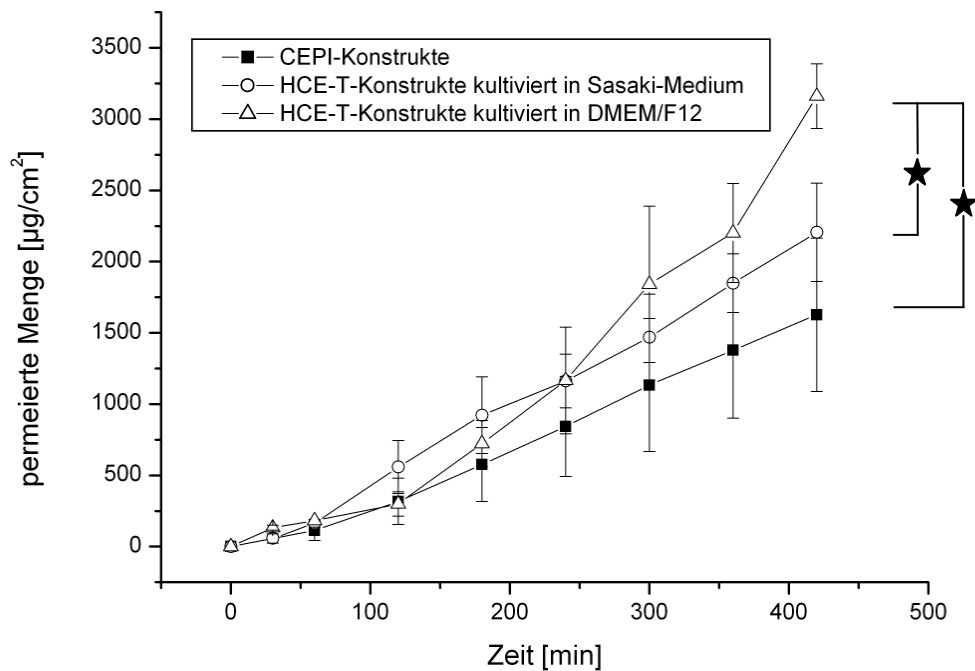


Abbildung 27 Permeation von Diclofenac-Na durch das humane Cornea-Konstrukt mit CEPI-Epithel (n=10), mit HCE-T-Epithel kultiviert in Sasaki-Medium (n=5) und mit HCE-T-Epithel kultiviert in DMEM/F12-Medium (n=3); ★ kennzeichnet Signifikanzen von $p < 0,05$

Tabelle 8: Vergleich von Arzneistoffflux und Permeationskoeffizient für die Permeation von Diclofenac-Na durch Cornea-Konstrukte mit CEPI-Epithel (n=10), mit HCE-T-Epithel kultiviert in Sasaki-Medium (n=5) und in DMEM/F12-Medium (n=3)

	Flux J [g/cm ² ·s]	Permeationskoeffizient P [cm/s]
HCE-T-Epithel (Sasaki-Medium)	$8,16 \cdot 10^{-8} \pm 1,84 \cdot 10^{-8}$	$16,32 \cdot 10^{-6} \pm 3,68 \cdot 10^{-6}$
HCE-T-Epithel (DMEM/F12)	$13,08 \cdot 10^{-8} \pm 2,06 \cdot 10^{-8}$	$26,16 \cdot 10^{-6} \pm 4,12 \cdot 10^{-6}$
CEPI-Epithel	$7,32 \cdot 10^{-8} \pm 2,11 \cdot 10^{-8}$	$14,63 \cdot 10^{-6} \pm 4,21 \cdot 10^{-6}$
Faktor (HCE-T/CEPI)	1,1 (Sasaki)/1,8 (DMEM/F12)	

Auch bei dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss des Kultivierungsmediums auf die Permeationseigenschaften der Konstrukte mit dem HCE-T-Epithel untersucht. Die Permeationskurve der in DMEM/F12 kultivierten Konstrukte (Abbildung 27) zeigt ab der 3. Stunde einen deutlich steileren Anstieg und damit einen höheren Permeationskoeffizienten (Tabelle 8). Der Unterschied ist sowohl zu den CEPI-Konstrukten, als auch zu den HCE-T-Konstrukten, die in Sasaki-Medium kultiviert wurden, signifikant ($p < 0,05$). Die Permeabilität ist um den Faktor 1,8 höher als bei den CEPI-Konstrukten. Im Gegensatz zum Timolol-HM kommt es beim eher

lipophilen Diclofenac-Na zu einer verbesserten Permeation durch den Austausch der Epithelzelllinie.

4.3.2.3 Permeation von Clindamycin-HCl

Schließlich wurde noch untersucht, wie sich das modifizierte humane Cornea-Konstrukt mit HCE-T-Epithel bei der Permeation von Clindamycin-HCl verhält. Die Permeationsgrafik (Abbildung 28) zeigt nahezu identische Permeationsraten für alle Konstrukte. Der Permeationskoeffizient ist um den Faktor 0,8 niedriger als der mit CEPI-Konstrukten ermittelte und zeigt keine signifikante ($p > 0,05$) Abweichung von diesen bei den durchgeführten Permeationsuntersuchungen (Tabelle 9), wenn die Kultivierung in Sasaki-Medium erfolgte.

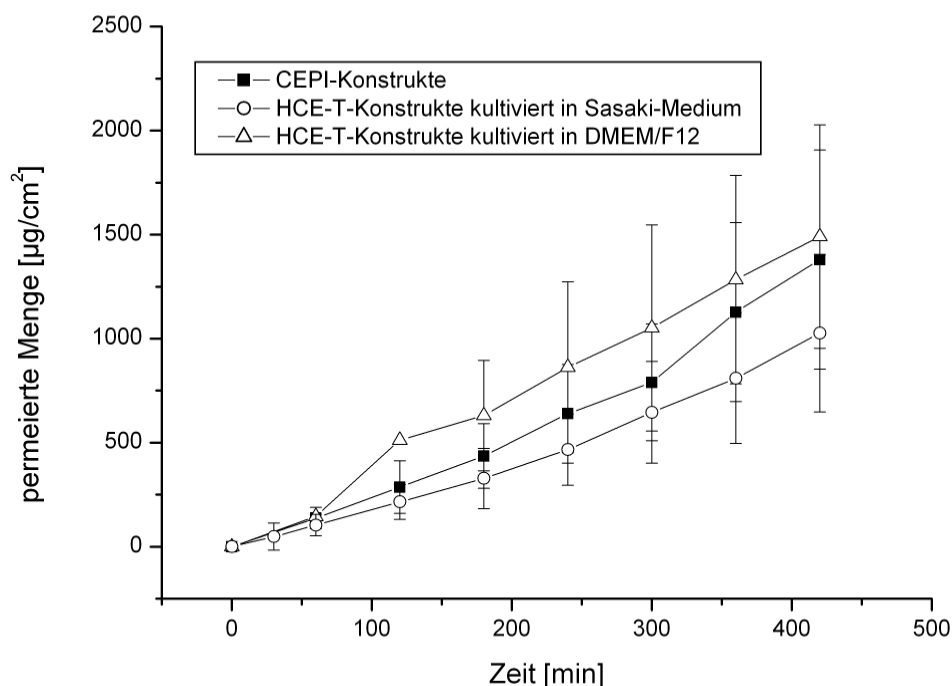


Abbildung 28 Permeation von Clindamycin-HCl durch das humane Cornea-Konstrukt mit CEPI-Epithel (n=10), mit HCE-T-Epithel kultiviert in Sasaki-Medium (n=9) und in DMEM/F12-Medium (n=3); ★ kennzeichnet Signifikanzen von $p < 0,05$

Der Wechsel des Kultivierungsmediums bringt bei dieser Versuchsreihe keinen Vorteil (Abbildung 28). Die Barriereigenschaften ähneln bei beiden Variationen stark denen des CEPI-Konstrukts und damit auch der humanen Cornea. Für Clindamycin-HCl wurde also eine gute Korrelation der Permeationskoeffizienten gefunden, unabhängig vom Kulturmedium.

Tabelle 9 Vergleich von Arzneistoffflux und Permeationskoeffizient für die Permeation von Clindamycin-HCl durch Cornea-Konstrukte mit CEPI-Epithel (n=10), mit HCE-T-Epithel kultiviert in Sasaki-Medium (n=9) und in DMEM/F12-Medium (n=3)

	Flux J [g/cm ² ·s]	Permeationskoeffizient P [cm/s]
HCE-T-Epithel (Sasaki-Medium)	$4,19 \cdot 10^{-8} \pm 1,95 \cdot 10^{-8}$	$8,38 \cdot 10^{-6} \pm 3,91 \cdot 10^{-6}$
HCE-T-Epithel (DMEM/F12)	$5,50 \cdot 10^{-8} \pm 1,78 \cdot 10^{-8}$	$11,00 \cdot 10^{-6} \pm 3,57 \cdot 10^{-6}$
CEPI-Epithel	$5,42 \cdot 10^{-8} \pm 2,41 \cdot 10^{-8}$	$10,84 \cdot 10^{-6} \pm 4,81 \cdot 10^{-6}$
Faktor (HCE-T/CEPI)	0,8 (Sasaki)/1,0 (DMEM/F12)	

4.3.2.4 Zusammenfassende Diskussion zu den Permeationsuntersuchungen durch humane Cornea-Konstrukte mit HCE-T- und CEPI-Epithel im Vergleich

Durch den Austausch der Epithelzelllinien sollte ein neues Modell für Permeationsuntersuchungen mit einer weit verbreiteten und gut charakterisierten Epithelzelllinie geschaffen werden.

Für Timolol-HM zeigen die Konstrukte mit HCE-T-Epithel eine deutlich geringere Permeabilität gegenüber den Konstrukten mit CEPI-Epithel und dem humanen Gewebe. Das HCE-T-Epithel bildet dichtere tight junctions aus als das CEPI-Epithel und bildet daher für den hydrophilen Arzneistoff Timolol eine größere Barriere. Eine Veränderung des Kultivierungsmediums in den letzten beiden Entwicklungsstufen verändert nicht die Barriereigenschaften, sondern hat lediglich einen Einfluss auf die Standardabweichung. Die Cornea-Konstrukte mit HCE-T-Epithel werden kleiner und fester, wenn das Kultivierungsmedium der CEPI-Zellen eingesetzt wird. Sie sind dadurch besser für Permeationsuntersuchungen geeignet, da sie robuster und somit besser zu handhaben sind.

Nach den Ergebnissen der Timolol-HM-Permeation sollte der relativ lipophile Arzneistoff Diclofenac-Na, der hauptsächlich auf transzellulärem Weg durch die Cornea permeiert, bei den Konstrukten mit HCE-T-Epithel keine Verminderung der Permeabilität im Vergleich zu den Konstrukten mit CEPI-Epithel zeigen. Die tight junctions beeinflussen den transzellulären Permeationsweg nicht in dem Maße wie den parazellulären. Die Permeationskoeffizienten sind demnach in der Tat für die beiden Konstrukt-Typen nahezu identisch. Kultiviert man die Konstrukte mit HCE-T-Epithel während der letzten zwei Entwicklungsstufen jedoch im Wachstumsmedium

der CEPI-Zellen, nimmt die Permeationsbarriere der Modelle gegenüber Diclofenac-Na wider Erwarten stark ab und damit die Permeabilität für den Arzneistoff zu. Dieser starke Anstieg des Permeationskoeffizienten war im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig zu erklären. Ein möglicher Grund könnte das für die HCE-T-Zellen „fremde“ CEPI-Wachstumsmedium sein, mit dem die Konstrukte ohne vorherige Adaption der Zellen kultiviert wurden. Das erklärt allerdings nicht, warum diese Schwächung der Permeationsbarriere nur beim Diclofenac-Na auftrat und nicht bei den anderen Arzneistoffen.

Bei den Permeationsuntersuchungen mit Clindamycin-HCl zeigen beide Cornea-Konstrukt-Typen mit CEPI- und HCE-T-Zellen als Epithel die gleichen Barriereigenschaften. Der Arzneistoff nimmt eine Mittelstellung zwischen den beiden anderen Substanzen in Bezug auf seine Hydro- bzw. Lipophilie ein und wird deshalb nicht so stark in seiner Permeabilität beeinflusst.

4.4 Zytotoxizitätsuntersuchungen an Zellmonolayern

Im Hinblick auf die Eignung von organotypischen humanen Cornea-Konstrukten als Modelle für Zytotoxizitätsstudien wurde zuerst das Verhalten der einzelnen Monolayerkulturen der unterschiedlichen Zelllinien gegenüber den eingesetzten Arzneistoffen und Natriumlaurylsulfat (SDS) als Standardirritans untersucht. Die schädigende Wirkung der Arzneistoffe kann in Zellkulturexperimenten u. a. direkt über die Beobachtung des morphologischen Erscheinungsbildes oder aber indirekt über die quantitative Bestimmung von in lebenden Zellen angereicherten Farbstoffen ermittelt werden.

Zytotoxizitätsuntersuchungen an Zellmonolayern sind schon lange als Alternative zur Bestimmung der dermalen und okularen Reizung in Tierversuchen anerkannt [Ekwall, 1983]. Die Reaktionen der Monolayerkulturen auf die Testsubstanzen liefern gut reproduzierbare Daten zur Quantifizierung der toxischen Wirkung dieser Stoffe. Allerdings ist ein direkter Vergleich zwischen den schädigenden Konzentrationen in vivo und in vitro oft nicht möglich, sondern nur die Einteilung in eine Rangordnung der relativen schädigenden Potentiale [Scaife, 1985].

Ein bewährter Test zur Messung von Proliferation oder Zytotoxizität ist der MTT-Test, bei dem es in den Mitochondrien der lebenden Zellen zur Reduktion des löslichen gelben Dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromids (MTT) zu einem blauen unlöslichen Formazan kommt [Mosman, 1983; Borenfreund et al., 1988]. Um die Zytotoxizität einer Substanz auf die cornealen Zelltypen zu bestimmen, wird mittels MTT-Test die mitochondriale Aktivität bestimmt und in Zellvitalitäts-Konzentrations-Kurven aufgetragen. Die mitochondriale Aktivität, die ein Maß für den Energieverbrauch der Zelle ist, wird dabei als Zellvitalität angesehen.

Ein anderer Ansatz zur Bestimmung der Zellvitalität ist die Überprüfung der Membranintegrität. Neutralrot diffundiert dabei durch die Zellmembran und reichert sich anschließend in den Lysosomen intakter Zellen an.

Zur Auswertung wird bei beiden Tests der LC_{50} -Wert herangezogen. Dabei wird die Menge des umgesetzten Farbstoffs durch UV-Spektroskopie ermittelt und auf einen Blindwert bezogen. Zur Bestimmung des Blindwerts wird der Zellmonolayer statt mit Arzneistoff mit einem wirkstofffreien Medium oder mit PBS-Puffer behandelt, und der resultierende Wert gleich einer 100%igen Überlebensrate gesetzt. Der LC_{50} -Wert stellt die Substanzkonzentration dar, bei der die Formazanbildung und damit die Zellvitalität im Vergleich zum Blindwert um 50 % reduziert ist.

4.4.1 Morphologische Veränderung der Zellen durch Einwirkung von zytotoxischen Substanzen

Die vier unterschiedlichen Zelllinien wurden nach 1-stündiger Exposition mit den Testsubstanzen im Mikroskop betrachtet und die Veränderungen ihrer Morphologie protokolliert. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen den eingesetzten Stoffen gefunden werden. Aus diesem Grund werden an dieser Stelle nur die morphologischen Veränderungen nach Einwirken von SDS für jede Zelllinie dargestellt.

Die Abbildung 29 zeigt die Epithelzelllinie CEPI nach 1-stündiger Exposition mit SDS in halbletaler (20 µg/ml) und letaler (320 µg/ml) Konzentration im Vergleich zu einer Zellkontrolle mit reinem PBS. Bei der halbletalen Konzentration wirkt ein Teil der Zellen völlig unverändert, während der andere Teil sich von der Kulturoberfläche abgelöst hat und abgerundet erscheint. Der Zellkern ist nicht mehr zu erkennen, und die Zellen bekommen ein blasenartiges Aussehen. Dieser Effekt ist bei der letalen Konzentration noch deutlicher ausgeprägt, gleichzeitig ballen sich die Zellen auch noch zu Agglomeraten zusammen.

In Abbildung 30 ist die Epithelzelllinie HCE-T nach 1-stündiger Exposition mit SDS in der gleichen halbletalen und letalen Konzentration wie oben zu sehen. Auch hier sieht man bei der halbletalen Konzentration ein vereinzelt Ablösen der Zellen mit gleichzeitiger Abrundung. Ein Unterschied zeigt sich bei der Behandlung mit einer letalen Konzentration von SDS. Die Zellen ballen sich nicht so stark zusammen wie bei der CEPI-Zelllinie, man erkennt aber ein deutliches Auflösen der Zellmembran.

Die Auswirkungen der unterschiedlichen Konzentrationen von SDS auf die Endothelzelllinie HENC sind in Abbildung 31 zu sehen. Bei der halbletalen Konzentration sind in dem gewählten Ausschnitt nur wenige von der Oberfläche gelöste Zellen zu sehen. Dafür erkennt man deutlich das Anschwellen der Zellmembran im Vergleich zum Zellkern und kleine Ausstülpungen, die auf ein baldiges Ablösen der Zellen von der Kultivierungsoberfläche hindeuten. Nach Behandlung mit einer letalen Konzentration von SDS sind die Zellen komplett von der Oberfläche gelöst und ballen sich ähnlich wie die CEPI-Zellen zusammen, dabei kann man vereinzelt auch ein Auflösen und Ineinanderfließen von Zellen erkennen.

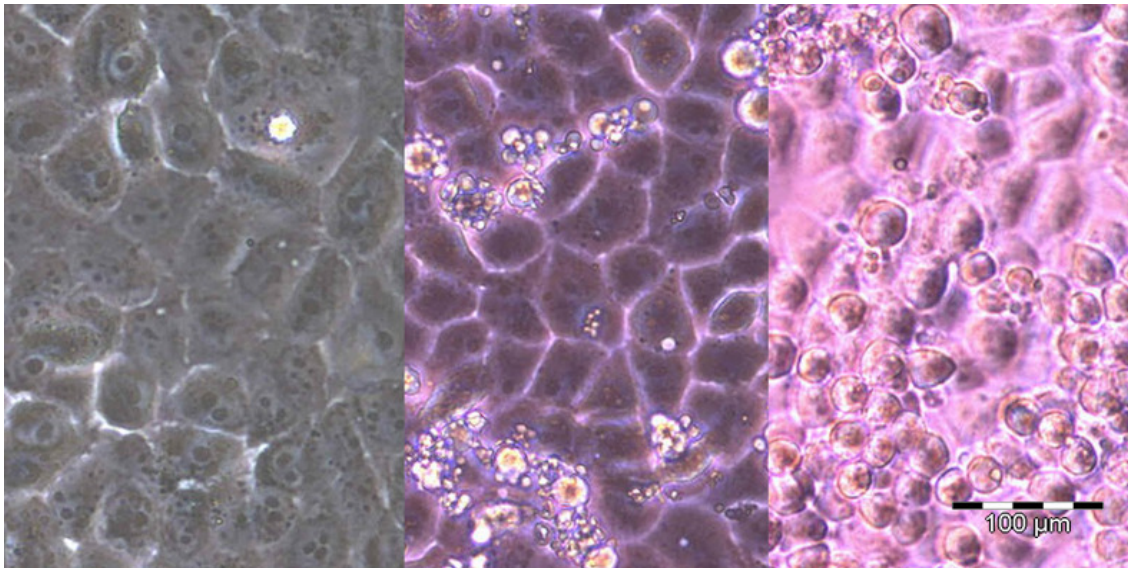


Abbildung 29: CEPI-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit reinem PBS (links), SDS in PBS in halbletaler (20 µg/ml, Mitte) und letaler Konzentration (320 µg/ml, rechts)

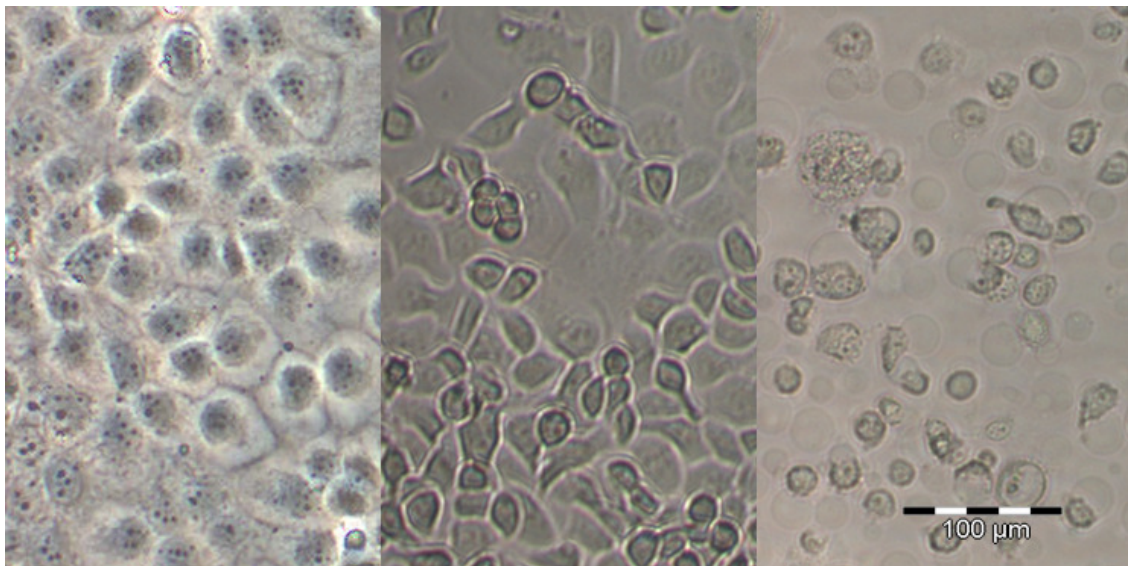


Abbildung 30: HCE-T-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit reinem PBS (links), SDS in PBS in halbletaler (20 µg/ml, Mitte) und letaler Konzentration (320 µg/ml, rechts)

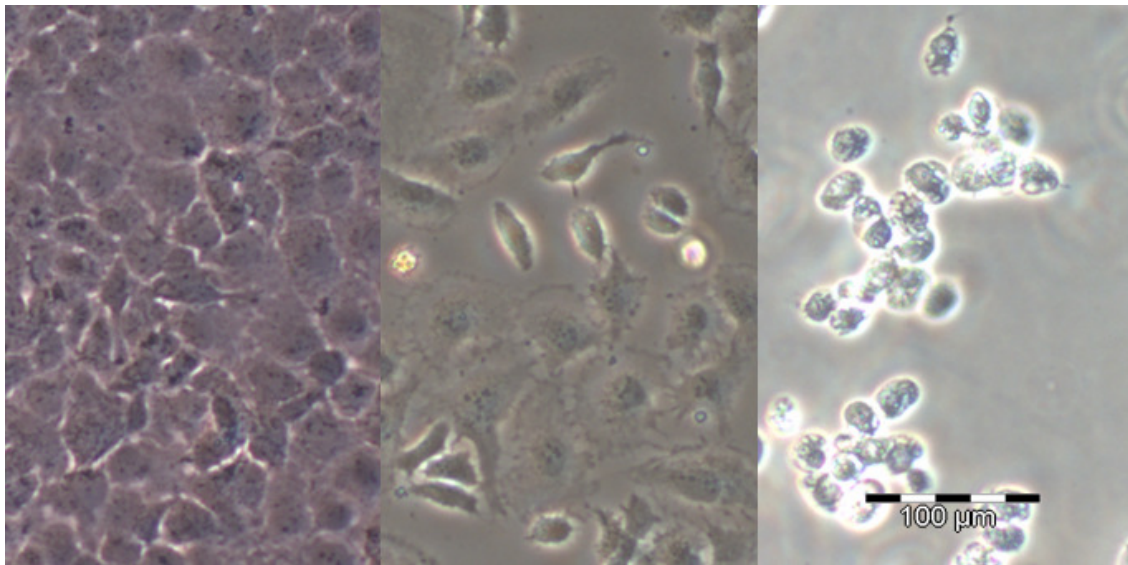


Abbildung 31: HENC-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit reinem PBS (links), SDS in PBS in halbletaler (20 µg/ml, Mitte) und letaler Konzentration (320 µg/ml, rechts)

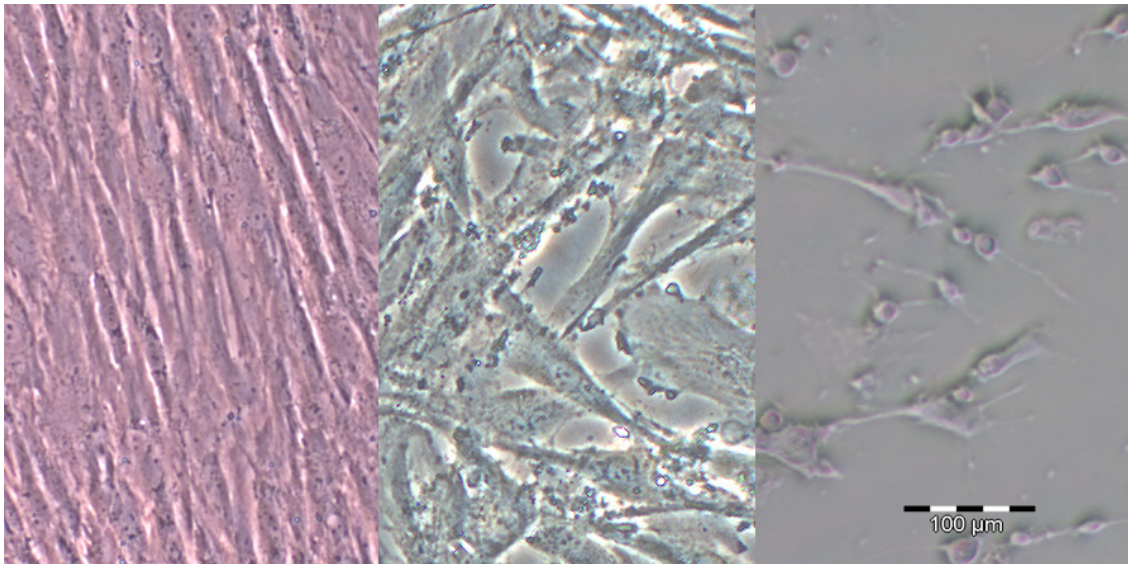


Abbildung 32: HUFIB-Zellen nach 1-stündiger Exposition mit reinem PBS (links), SDS in PBS in halbletaler (15 µg/ml, Mitte) und letaler Konzentration (320 µg/ml, rechts)

Die Abbildung 32 zeigt die cornealen Fibroblasten nach 1-stündiger Exposition mit SDS in einer abweichenden halbletalen Konzentration von 15 µg/ml und der letalen Konzentration von 320 µg/ml. Durch die lang gestreckte Spindelform der Fibroblasten kann man die morphologischen Veränderungen mit zunehmender SDS-Konzentration sehr gut verfolgen. Bei Exposition mit der halbletalen Konzentration verbreitern sich die Zellen, und die Zellmembran bildet Ausstülpungen. Die Oberfläche der Zellen wirkt dadurch nicht mehr gleichmäßig, und es sind auch schon einige freigesetzte Zellfragmente zu erkennen, die auf eine Lyse der Zellen hindeuten. Die hohe SDS-Konzentration führt zu einem starken Ablösen der Zellen von der Kultivierungsoberfläche und zu Zellyse. Die verbleibenden Zellen haben kaum noch Ähnlichkeit mit den Ausgangszellen. Sie nehmen im abgelösten Zustand eine runde Form ein.

Die Versuche zeigen, dass es möglich ist, anhand der morphologischen Veränderungen die Schädigung der Zellen durch zytotoxische Substanzen zu verfolgen. Allerdings ist es mittels mikroskopischer Untersuchung nicht möglich den Grad dieser Schädigung zu quantifizieren, da die Vorgänge nicht gleichmäßig über den Zellrasen verteilt ablaufen. Zumeist werden die weniger dicht besiedelten Randbereiche des Kulturgefäßes zuerst durch das toxische Agens angegriffen. Eine weitere Schwierigkeit sind die abgelösten Zellen, die durch Konvektion im Medium noch intakte Bereiche verdecken können.

Zur Quantifizierung der Zellschädigung wurden daher indirekte Bestimmungen in Form von Farbstoff-Tests durchgeführt, bei denen ein proportionaler Zusammenhang zwischen Zellvitalität und Farbstoffmenge besteht.

4.4.2 Vergleichende Untersuchungen zum zytotoxischen Potential ausgewählter Substanzen an den verschiedenen Zelllinien mittels MTT-Test

4.4.2.1 Zytotoxizitätsuntersuchung von SDS an Zellmonolayern

Das anionische Tensid SDS wird in dieser Arbeit für Zytotoxizitätsuntersuchungen eingesetzt, da seine lokal irritierende Wirkung schon seit längerer Zeit bekannt ist, und es aus diesem Grund häufig als Standardirritans verwendet wird [Effendy et al., 1996; Jelinek, 2001]. Im Draize-Test verursacht SDS am Kaninchenauge u. a. eine starke Schwellung der Cornea und eine Abnahme der optischen Linsenfunktion und

ist daher als stark augenreizend einzuordnen [Grant, 1974; Kennah et al., 1989; Bantseev et al., 2003].

Die Abbildung 33 zeigt ein Vitalitäts-Konzentrations-Profil für das Modellirritans SDS gelöst in PBS an den vier verschiedenen Zelllinien. Man sieht keine Unterschiede im Vitalitätsabfall, der Konzentrationsbereich der LC_{50} liegt zwischen 14,9 und 21,8 $\mu\text{g/ml}$ (Tabelle 10).

Tendenziell kann man sagen, dass die drei immortalisierten Zelllinien etwas weniger empfindlich gegenüber SDS sind als die nativen cornealen Fibroblasten. Die Unterschiede der halbletalen Konzentrationen sind allerdings nicht signifikant ($p>0,05$).

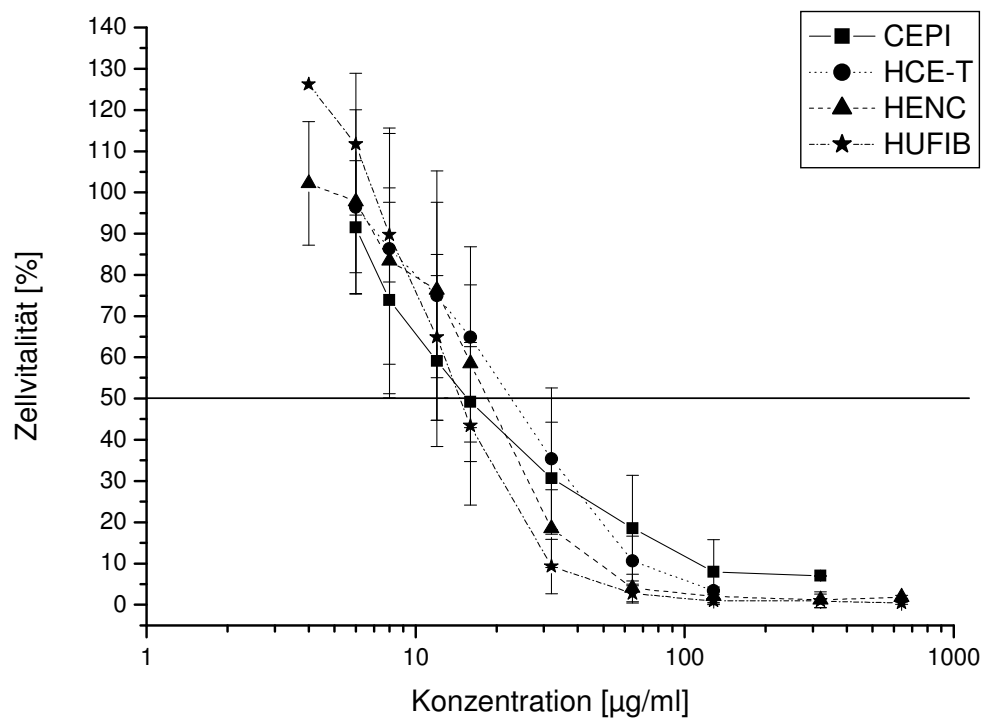


Abbildung 33: Zellvitalitäts-Konzentrations-Kurven für SDS in PBS; die Linie kennzeichnet die Abnahme der Zellvitalität um 50 % bezogen auf reinen PBS; $n=5-8$; ★ kennzeichnet Signifikanzen von $p<0,05$

Tabelle 10: LC_{50} -Werte für SDS in PBS ermittelt an Monolayerkulturen; $n=5-8$

	HENC	HUFIB	CEPI	HCE-T
SDS [$\mu\text{g/ml}$]	$18,1 \pm 5,1$	$14,9 \pm 3,2$	$19,2 \pm 8,1$	$21,8 \pm 8,1$

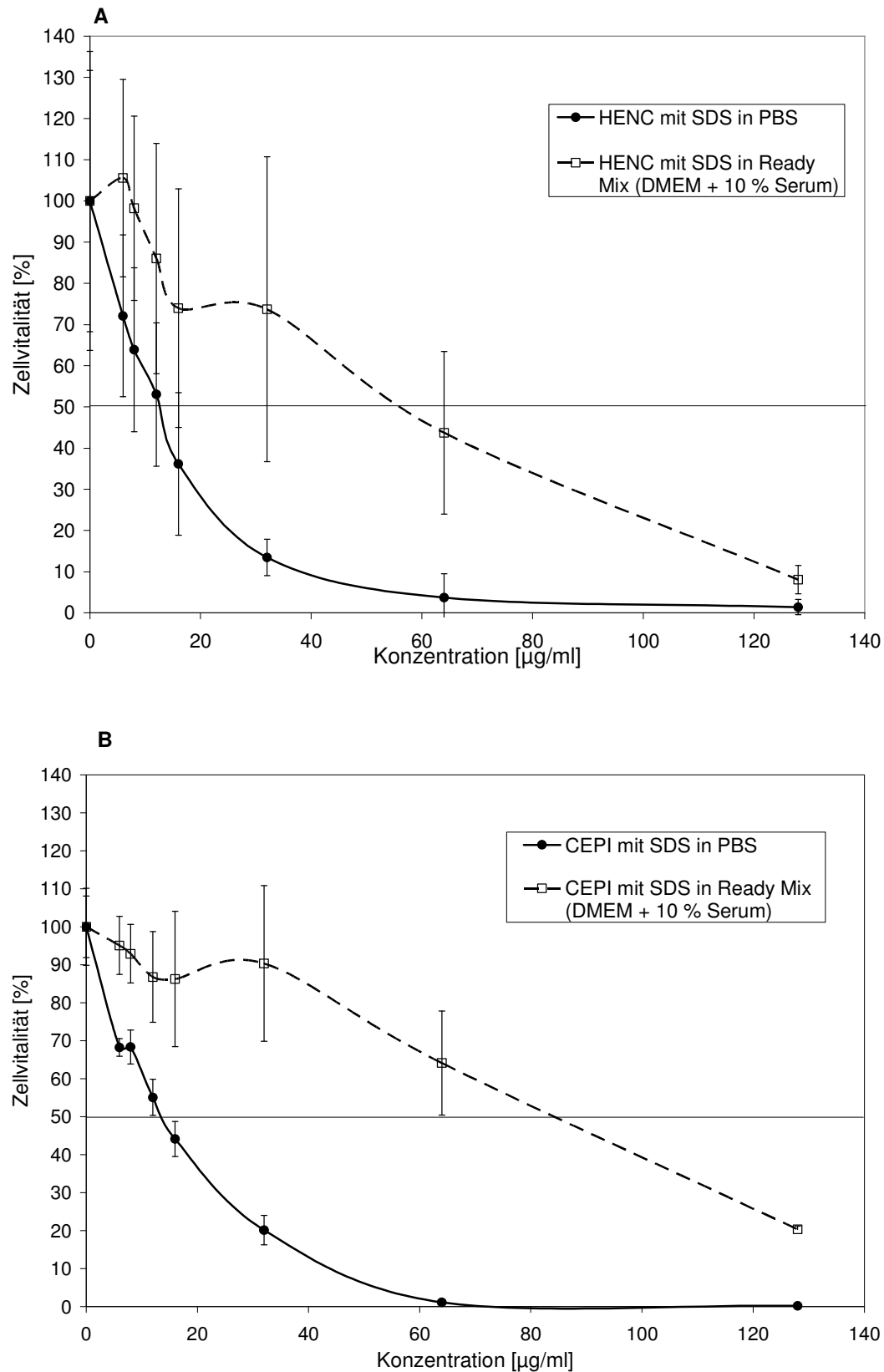


Abbildung 34: Zellvitalitätskurven von HENC- (A) und CEPI-Monolayern (B) aufgenommen nach Behandlung mit SDS gelöst in PBS (—) und Ready Mix mit 10 % Serum (---); n=3

Bei einer weiteren Versuchsreihe mit den Zelllinien HENC und CEPI, bei der SDS im Wachstumsmedium Ready Mix gelöst wurde, wurden deutlich höhere LC_{50} -Werte gefunden als in der Versuchsreihe mit PBS als Lösungsmittel (Abbildung 34). Daraus wird deutlich, dass ein serumhaltiges Medium einen protektiven Einfluss auf die Zellen hat. In diesem Fall ist zu vermuten, dass das SDS an die Proteine im Serum gebunden wurde und nicht mehr so stark mit den Zellen interagieren konnte. Schon Benoit et al. (1987) fanden einen Anstieg der letalen Dosis von SDS auf Fibroblastenmonolayer um den Faktor 13, wenn der Tensid-Lösung 10 % fetales Kälberserum zugesetzt wurde. Sie konnten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der Serumkonzentration und der Abnahme der Zytotoxizität des Tensids zeigen. Da Serum ein Naturprodukt mit schwankender Zusammensetzung ist, kann nicht gewährleistet werden, dass der Proteingehalt immer identisch ist. Um diesen Störfaktor bei den weiteren Untersuchungen auszuschließen, wurden die Arzneistoffe in den folgenden Versuchen nur noch in serumfreiem Phosphatpuffer gelöst.

4.4.2.2 Zytotoxizitätsuntersuchung von Diclofenac-Na, Clindamycin-HCl und Timolol-HM an Zellmonolayern

Weitere Zytotoxizitätsuntersuchungen an Zellmonolayern wurden mit den bereits für die Permeation eingesetzten Arzneistoffen Diclofenac-Na, Clindamycin-HCl und Timolol-HM durchgeführt.

Abbildung 35 zeigt die Zellvitalitäts-Konzentrations-Kurve von Diclofenac-Na für die unterschiedlichen Zelllinien. Die LC_{50} -Werte der Fibroblasten, der Endothel- und der Epithelzelllinie HCE-T befinden sich in einem engen Konzentrationsbereich zwischen 425-450 $\mu\text{g/ml}$. Bei der Epithelzelllinie CEPI ist ein etwas flacherer Abfall der Kurven zu beobachten, woraus sich mit 544 $\mu\text{g/ml}$ ein signifikant ($p < 0,05$) höherer LC_{50} -Wert gegenüber den Fibroblasten und der HCE-T-Zelllinie ergibt (Tabelle 11).

Die Abnahme der Zellvitalität unter Einwirkung von Clindamycin-HCl auf die verschiedenen Zelllinien ist in Abbildung 36 zu sehen. Man erkennt wie bei SDS und Diclofenac-Na einen sigmoiden Verlauf der Kurven. Die halbletalen Konzentrationen sind allerdings um den Faktor 1,5-3 höher als die für Diclofenac-Na. Sie liegen zwischen 1127-1325 $\mu\text{g/ml}$ für die Fibroblasten, Endothel- und HCE-T-Zellen. Nur die CEPI-Zellen sind mit einer LC_{50} von 835 $\mu\text{g/ml}$ signifikant ($p < 0,05$) empfindlicher gegenüber Clindamycin-HCl (Tabelle 11). Das Antibiotikum Clindamycin-HCl ist damit deutlich weniger toxisch als das Antiphlogistikum Diclofenac-Na.

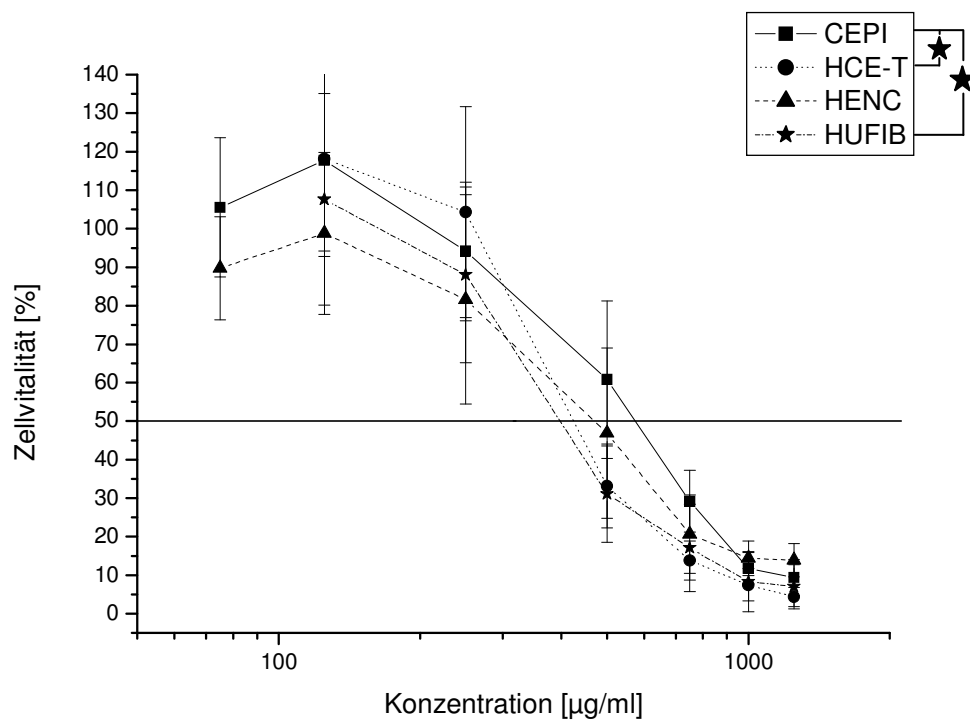


Abbildung 35: Zellvitalitäts-Konzentrations-Kurven für Diclofenac-Na in PBS; n=4-11; ★ kennzeichnet Signifikanzen von $p < 0,05$

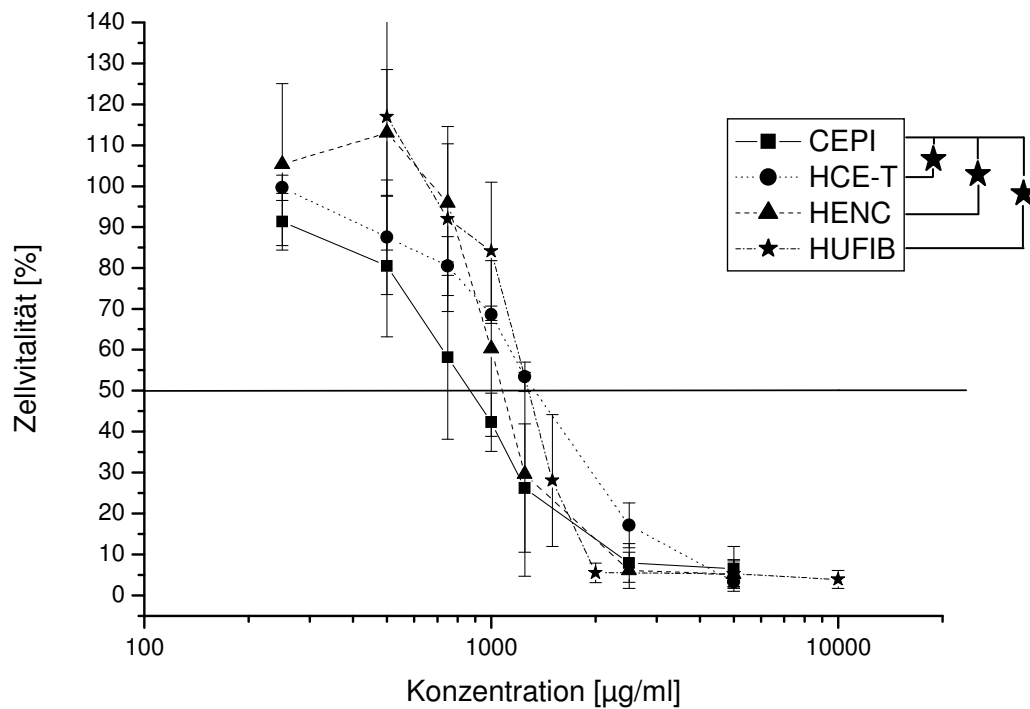


Abbildung 36: Zellvitalitäts-Konzentrations-Kurven für Clindamycin-HCl in PBS; n=4-6; ★ kennzeichnet Signifikanzen von $p < 0,05$

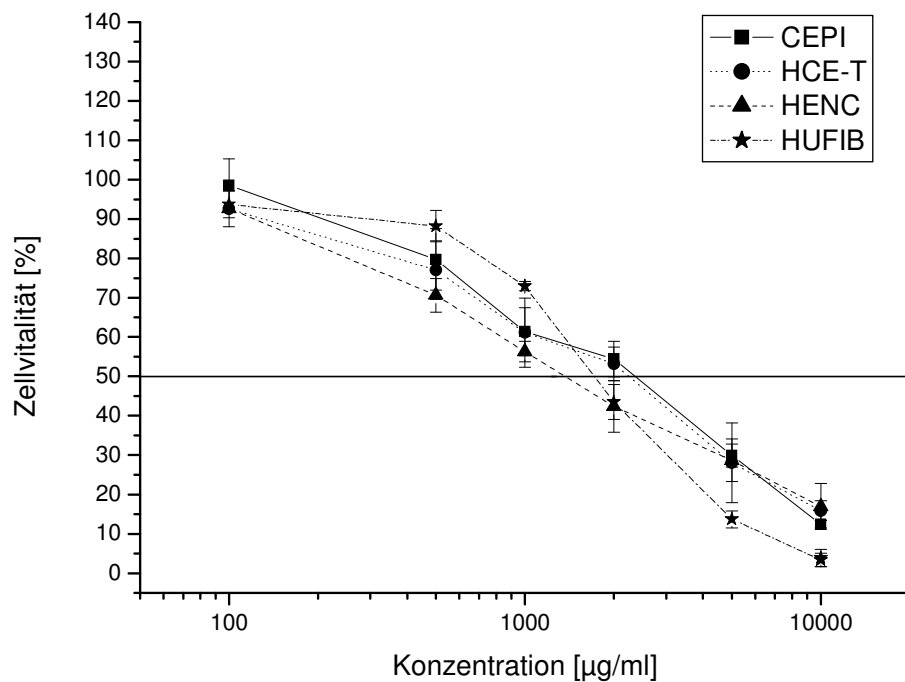


Abbildung 37: Zellvitalitäts-Konzentrations-Kurven für Timolol-HM in PBS; n=3-4; ★ kennzeichnet Signifikanzen von $p < 0,05$

Tabelle 11: LC_{50} -Werte für die Arzneistoffe Diclofenac-Na, Clindamycin-HCl und Timolol-HM in PBS an Monolayerkulturen ermittelt; n=3-11

	HENC	HUFIB	CEPI	HCE-T
Diclofenac-Na [µg/ml]	450 ± 123	425 ± 97	544 ± 80	430 ± 88
Clindamycin-HCl [µg/ml]	1127 ± 200	1196 ± 162	837 ± 157	1325 ± 205
Timolol-HM [µg/ml]	1637 ± 187	1918 ± 134	2381 ± 234	2122 ± 265

Der dritte Arzneistoff, der in den Permeationsuntersuchungen verwendet wurde, ist das Timolol-HM. In Abbildung 37 sind die Zellvitalitäts-Konzentrations-Kurven für die vier Zelllinien zu sehen. Auffällig ist bei diesem Arzneistoff, dass die Kurven im Vergleich zu den vorherigen Substanzen keinen deutlich sigmoiden Abfall zeigen. Es ergibt sich fast ein linearer Zusammenhang, der sigmoide Charakter der Kurven ist nur andeutungsweise zu erkennen.

Die halbletalen Konzentrationen sind mit Werten zwischen 1637 und 2381 µg/ml etwas höher als beim Clindamycin-HCl (Tabelle 11), wobei die Endothelzellen bei diesem Arzneistoff eine etwas ausgeprägtere Empfindlichkeit zeigen, die jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$) ist. Die beiden Epithelzelllinien sind am unempfindlichsten gegenüber Timolol-HM.

4.4.2.3 Zytotoxizitätsuntersuchungen von kokultivierten Epithelzelllinien und cornealen Fibroblasten

Die Kokultivierung der unterschiedlichen cornealen Zellarten trägt im Cornea-Konstrukt entscheidend zur Bildung eines organotypischen Phänotyps mit mehrschichtigem Epithel, Keratinbildung und Basalmembranbildung bei [Reichl, 2003]. Aus diesem Grund wurden die beiden Epithelzelllinien CEPI und HCE-T mit cornealen Fibroblasten kokultiviert (s. Abschnitt 3.2.1.4). Nach 1 Woche wurde jeweils ein MTT-Test mit dem Standardirritans SDS an den verschiedenen Epithelzelllinien und den cornealen Fibroblasten durchgeführt.

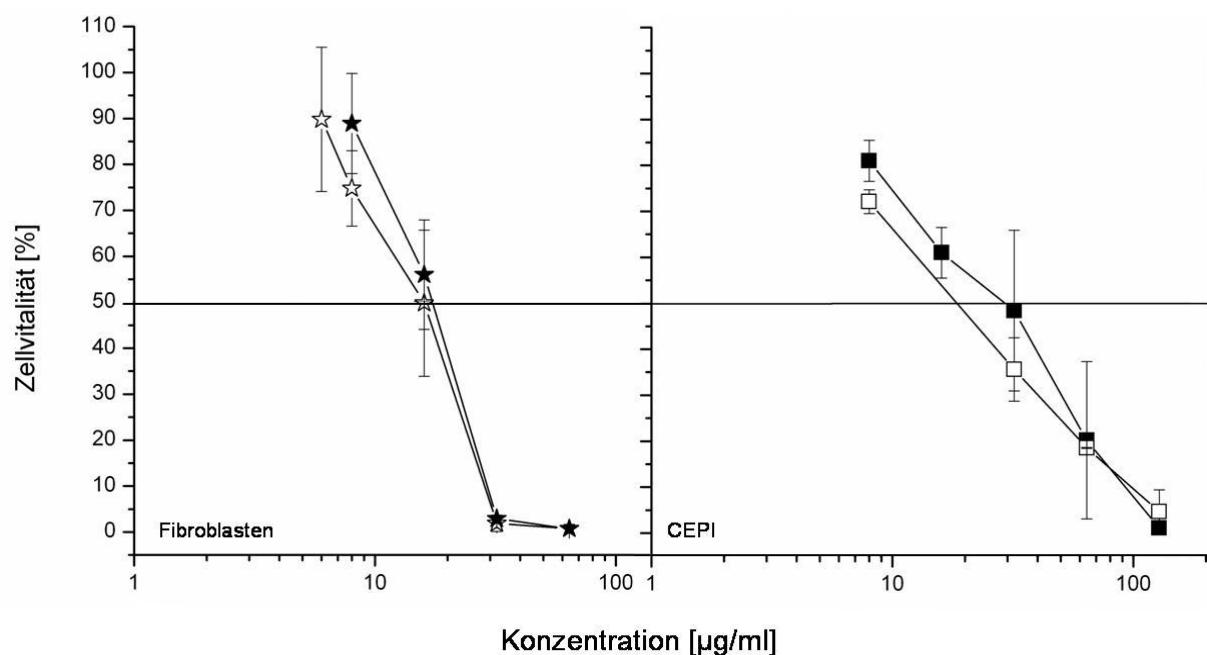


Abbildung 38: Zellvitalitäts-Konzentrations-Kurven für SDS an allein (☆/□) und kokultivierten (★/■) Fibroblasten (links) und Epithelzellen CEPI (rechts); n=2-3

In Abbildung 38 sind die Zellvitalitäts-Konzentrations-Kurven von SDS für die Epithelzelllinie CEPI und die cornealen Fibroblasten HUFIB, jeweils separat und in Kokultur, dargestellt. Die Kurven der beiden Zelllinien allein und in Kokultur verlaufen jeweils nahezu deckungsgleich, es kommt also zu keiner eindeutigen Beeinflussung in Bezug auf die zytotoxische Wirkung des SDS. Die halbletale Konzentration für die kokultivierten Epithelzellen ist mit 29,3 µg/ml tendenziell etwas höher als die der separat kultivierten Zellen mit 19,6 µg/ml. Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$).

In Abbildung 39 ist der Vergleich zwischen allein und kokultivierten Epithelzellen der Zelllinie HCE-T und cornealen Fibroblasten zu sehen. Die beiden Zellvitalitäts-Konzentrations-Kurven der Fibroblasten verlaufen wieder deckungsgleich. Dagegen weisen die Kurven der Zelllinie HCE-T einige Unterschiede auf. Im Bereich der LC_{50} zeigt sich bei den kokultivierten Epithelzellen eine Art Plateau, während bei den Konzentrationen $<10 \mu\text{g/ml}$ und $>32 \mu\text{g/ml}$ SDS die Zellvitalitäten unterhalb der Vitalitäten der allein kultivierten HCE-T-Zellen liegen. Die halbletale Konzentration ist hingegen etwas höher als bei den separat kultivierten HCE-T-Epithelzellen. In welcher Form die cornealen Fibroblasten die Epithelzelllinie HCE-T beeinflussen, lässt sich im Rahmen dieser Untersuchung daher nicht mit Sicherheit sagen, vermutlich handelt es sich um Unterschiede in der wechselseitigen Kommunikation der Zellen.

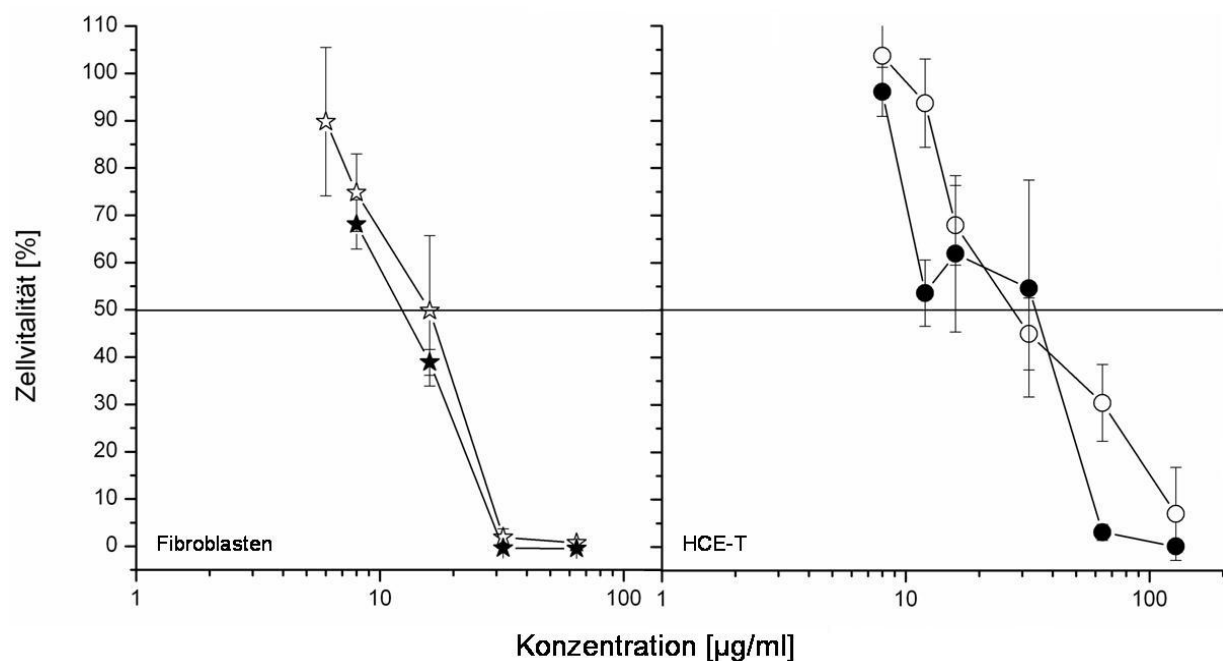


Abbildung 39: Zellvitalitäts-Konzentrations-Kurven für SDS an allein (☆/□) und kokultivierten (★/■) Fibroblasten (links) und Epithelzellen HCE-T (rechts); n=2-5

4.4.2.4 Einfluss des pH-Wertes auf die Zellvitalität

Der pH-Wert von wässrigen Augenarzneimitteln ist für die Löslichkeit und Stabilität der Wirkstoffe, die Verträglichkeit am Auge und die Wirksamkeit des Präparates von großer Bedeutung. In der Tränenflüssigkeit herrscht ein physiologischer pH-Wert von 7,4, gleichzeitig hat das Auge nur eine begrenzte Pufferkapazität im Unterschied zum

Blut. Aus diesem Grund sollten die Zubereitungen zur Minimierung von Reizerscheinungen möglichst einen pH-Wert im Bereich um 7,4 besitzen. Allerdings sind viele Arzneistoffe im schwach sauren Milieu stabiler, was zu einem Kompromiss zwischen Verträglichkeit und Stabilität, Euhydrie genannt, führt. Der schmerzfreie Toleranzbereich liegt bei pH-Werten zwischen 7 und 9 [Dolder und Skinner, 1983].

Um den Einfluss des pH-Wertes auf die Zellvitalität zu untersuchen, wurde PBS mit konzentrierter Säure bzw. Lauge auf pH-Werte zwischen 4 und 11 gebracht. Bei dieser Vorgehensweise blieb die Isotonie der Prüflösungen erhalten, da bereits geringe Mengen Zusatz zu einer pH-Wert-Verschiebung führten.

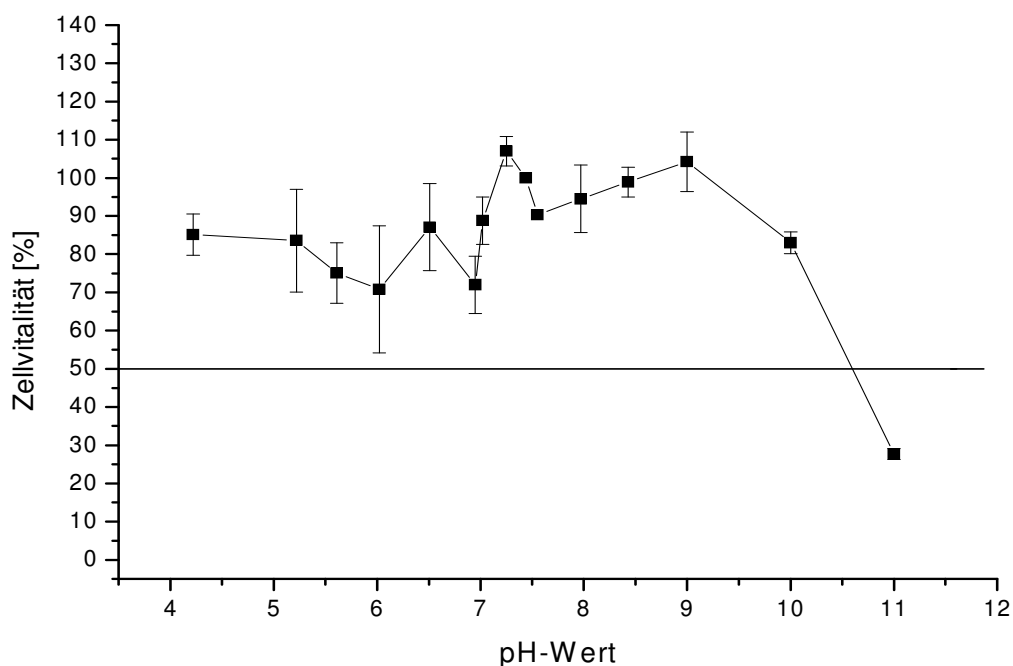


Abbildung 40: pH-Einfluss auf die Zellvitalität der CEPI-Zellen; n=4

Die Epithelzelllinie CEPI zeigte bei pH-Werten unter 6,5 eine leicht reduzierte Zellvitalität von ca. 80 % (Abbildung 40). Deutlicher waren die Auswirkungen eines zu hohen pH-Wertes von über 9. In diesem Bereich sank die Zellvitalität rapide ab, sie betrug bei einem pH-Wert von 11 nur noch knapp 30 %.

Die Endothelzelllinie HENC reagierte insgesamt sensibler auf pH-Wert-Verschiebungen. Bei pH-Werten kleiner 7 und größer 8,5 sank die Zellaktivität auf ca. 70 % (Abbildung 41). Im sauren Bereich war die Vitalität geringer, als bei der CEPI-Zelllinie, während im Alkalischen zwar auch ein deutlicher Abfall zusehen war, die Vitalität bei einem pH-Wert von 11 aber immer noch knapp 60 % betrug und damit höher war als bei den CEPI-Zellen.

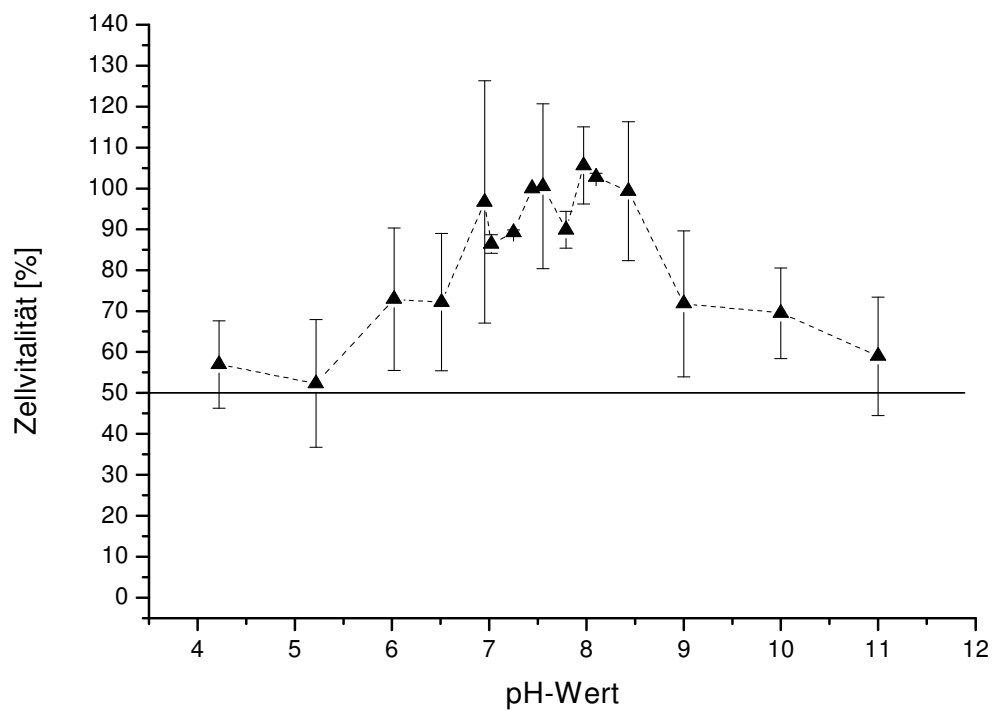


Abbildung 41: pH-Einfluss auf die Zellviitalität der HENC-Zellen; n=5

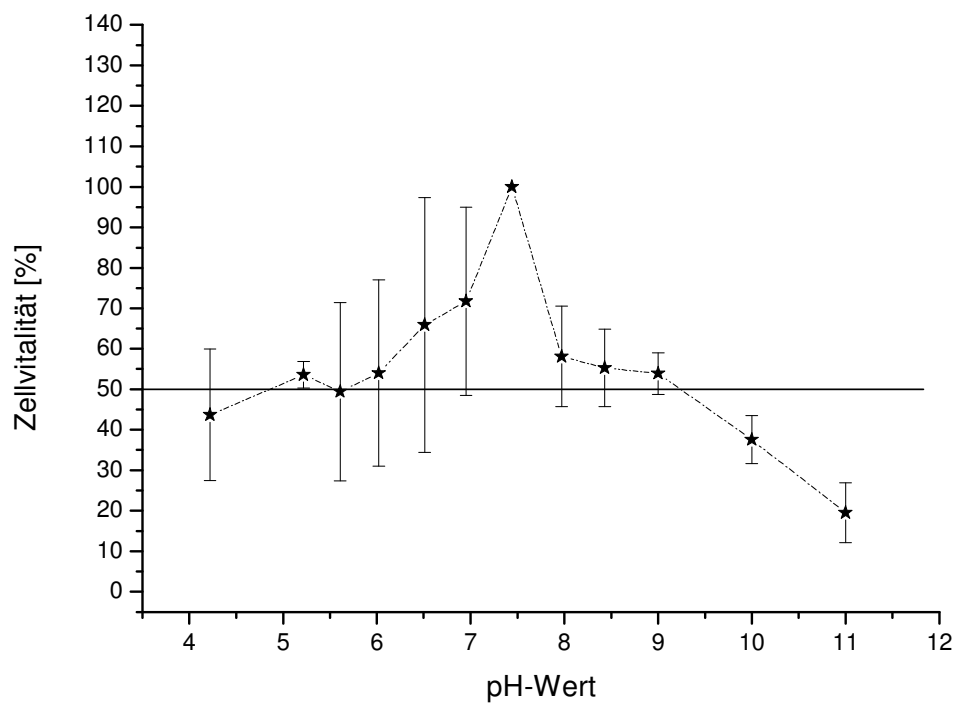


Abbildung 42: pH-Einfluss auf die Zellviitalität der Fibroblasten; n=3

Die cornealen Fibroblasten zeigten eine noch stärkere Sensibilität gegenüber veränderten pH-Werten. Bereits ein pH-Wert von 7 führte zu einer Vitalitätsabnahme um 30 % gegenüber dem physiologischen pH-Wert von 7,4 (Abbildung 42). Bei pH-Werten über 8 sank die Zellvitalität auf ca. 60 % und bei pH 11 betrug sie nur noch knapp 20 %.

Die drei cornealen Zelltypen reagieren also unterschiedlich auf Änderungen des pH-Wertes. Während die Epithelzellen erst bei pH-Werten über 9 eine deutliche und im schwach sauren Bereich nur eine leichte Vitalitätsabnahme zeigen, reagieren die Endothelzellen stärker auf pH-Werte außerhalb des schmerzfreien Bereiches. Am empfindlichsten in Bezug auf den pH-Wert sind die Fibroblasten, die schon bei kleinen Abweichungen vom physiologischem pH-Wert deutliche Vitalitätseinbußen zeigen.

4.4.3 Vergleichende Zytotoxizitätsuntersuchung von SDS am Zellmonolayer mittels Neutralrot-Test

Als zweiter Test zur Bestimmung des zytotoxischen Potentials von SDS wurde in dieser Arbeit der Neutralrot-Test eingesetzt, der in Verbindung mit dem HET-CAM-Test von den deutschen Behörden und der EU als Vorstufe für den Draize-Test anerkannt ist (s. Abschnitt 2.6.2).

Der Vergleich der ermittelten LC_{50} -Werte für das Standardirritans SDS zeigt, dass die Ergebnisse beider Zytotoxizitätstests keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) aufweisen (Abbildung 43).

Da ein Vergleich der halbletalen Konzentrationen nur eine grobe Einordnung zulässt, werden in Abbildung 44 die Zellvitalitäts-Konzentrations-Kurven gegenüber gestellt.

Auch der Verlauf dieser Kurven ist sehr ähnlich. Bei den Fibroblasten erkennt man bei geringen Konzentrationen eine geringere Zellvitalität im Neutralrot-Test, während man bei den Epithelzellen über den ganzen Konzentrationsbereich eine höhere Zellvitalität im Neutralrot-Test beobachten kann. Obwohl beide Tests an unterschiedlichen Funktionen der Zellen angreifen, findet man eine gute Übereinstimmung für das schädigende Potential von SDS.

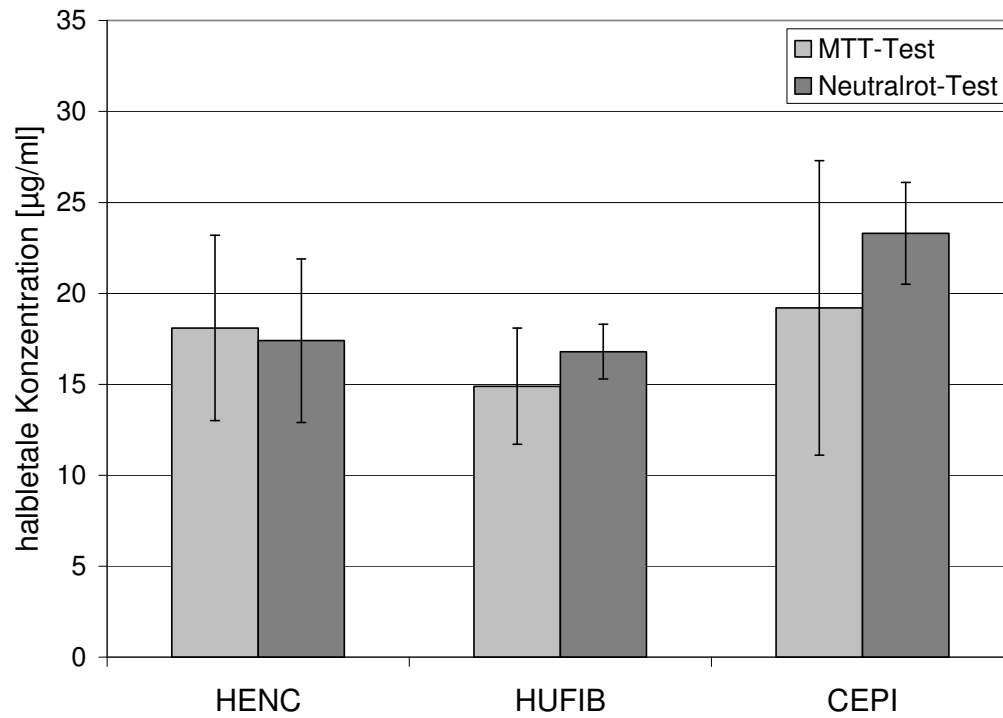


Abbildung 43: Vergleich der halbletalen Konzentrationen von SDS an den Zelllinien HENC, HUFIB und CEPI; n=3-7; ★ kennzeichnet Signifikanzen von $p < 0,05$

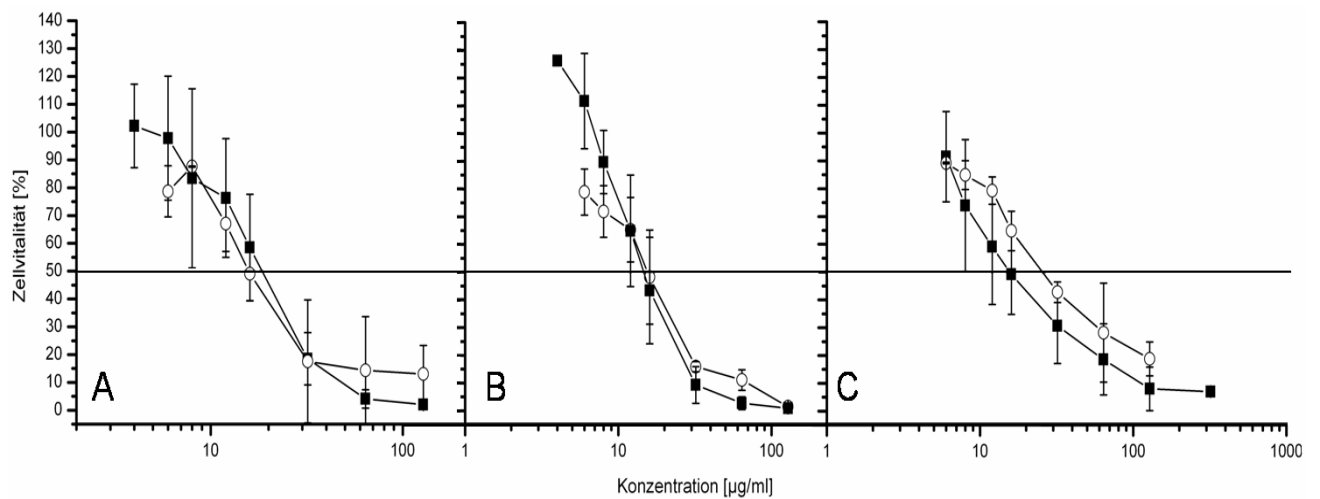


Abbildung 44: Vergleich der Zellvitalitäts-Konzentrations-Kurven ermittelt mit MTT-Test (■) und Neutralrot-Test (○) für die Zelllinien HENC (A), HUFIB (B) und CEPI (C); n=3-7

4.4.4 Zusammenfassende Diskussion zu den vergleichenden Untersuchungen zum zytotoxischen Potential ausgewählter Substanzen an den verschiedenen Zelllinien

Die Schädigung von Zellen durch zytotoxische Substanzen kann man sehr gut an den morphologischen Veränderungen der Zellen erkennen. Lücken im Zellrasen, eine abgerundete Form der Zellen und das Ablösen von der Kultivierungsfläche sind deutliche Zeichen für geschädigte Zellpopulationen. Die morphologischen Veränderungen der Zellen waren bereits bei einer halbletalen Konzentration gut zu erkennen, während bei einer letalen Konzentration nur noch vereinzelt intakte Zellen zu sehen waren. Für eine grobe Einteilung des zytotoxischen Potentials von Substanzen reicht diese Methode aus, nur im Bereich geringer und mittlerer Schädigungen ist die mikroskopische Betrachtung zu ungenau [Bhatia und Yetter, 2008].

Für eine genauere Quantifizierung der Schädigung wurden aus diesem Grund Zytotoxizitätstests eingesetzt, die über eine Farbreaktion die Vitalität der Zellen bestimmen. Mit diesen Vitalitätsbestimmungen an Zellmonolayern sollte die Zytotoxizität verschiedener Substanzen sowie der Einfluss des pH-Wertes und des Serumgehalts des Mediums untersucht werden. Eine Nutzung humaner Cornea-Konstrukte für solche Zytotoxizitätsuntersuchungen war das Ziel der Untersuchungen.

Für das Standardirritans SDS konnten identische halbletale Konzentrationen für die eingesetzten Zelllinien gefunden werden. Dabei waren die nativen cornealen Fibroblasten am empfindlichsten und die Epithelzelllinie HCE-T am unempfindlichsten gegenüber dem Tensid. Die Unterschiede der LC_{50} -Werte zwischen 14,9 und 21,8 waren allerdings nicht signifikant ($p > 0,05$). Bei Untersuchungen an humanen immortalisierten Hautkeratinozyten fand Jelinek (2001) nach 24-stündiger Inkubation eine halbletale Konzentration von 17,9 $\mu\text{g/ml}$ für SDS.

Ein wichtiger Einflussfaktor bei der Untersuchung des schädigenden Potentials einer Substanz ist das Medium, in dem der zu untersuchende Stoff gelöst wird. Ein Zusatz von Serum, das in den Kulturmedien der verwendeten Zellen in Konzentrationen von 5-10 % vorhanden ist, führte zu erhöhten LC_{50} -Konzentrationen bei SDS. Die Proteine des Serums können einen Teil des toxischen Stoffes binden und ihn so für die Zellen unschädlich machen [Benoit et al., 1987]. Da die Proteinbindungskapazitäten für verschiedene Stoffe unterschiedlich sind und darüber hinaus die

qualitative und quantitative Zusammensetzung des Serums von Charge zu Charge nicht konstant ist, wurden alle weiteren Untersuchungen mit serumfreiem PBS durchgeführt.

Mit den Arzneistoffen Diclofenac-Na, Clindamycin-HCl und Timolol-HM wurden die Beispielarzneistoffe aus den Permeationsuntersuchungen auf ihr schädigendes Potential hin untersucht. Die gefundenen halbletalen Konzentrationen lagen für Diclofenac-Na zwischen 425 und 544 µg/ml. Beim Clindamycin-HCl waren sie mit 837-1325 µg/ml ungefähr doppelt so hoch und eine weitere Steigerung auf fast das Doppelte war für Timolol-HM mit LC₅₀-Werten von 1637-2381 µg/ml zu beobachten. Die Unterschiede in der Empfindlichkeit zwischen den einzelnen Zelllinien für die jeweilige Substanz waren sehr gering, lediglich die Epithelzelllinie CEPI zeigte bei Diclofenac-Na und Clindamycin-HCl signifikante ($p < 0,05$) Abweichungen. Es konnte keine generelle Aussage darüber getroffen werden, ob eine Zelllinie empfindlicher auf schädigende Substanzen reagiert als eine andere.

Ein wichtiger Aspekt im Hinblick auf die Zytotoxizitätsuntersuchungen am Cornea-Konstrukt ist die gegenseitige Beeinflussung der Zellarten. Gerade die stromal-epithelialen Wechselwirkungen werden immer wieder in der Literatur beschrieben [Pancholi et al., 1998; El-Ghalbzouri et al., 2002]. Daher wurden die beiden Epithelzelllinien CEPI und HCE-T mit cornealen Fibroblasten für 7 Tage kokultiviert und anschließend mit SDS die Zellvitalitäts-Konzentrations-Kurven aufgenommen. Bei der CEPI-Zelllinie und den cornealen Fibroblasten kam es zu keiner Beeinflussung der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber SDS durch eine Kokultivierung. Die HCE-T-Zelllinie reagierte dagegen mit einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber hohen SDS-Konzentrationen auf ein Vorhandensein von cornealen Fibroblasten. In diesem Fall musste man also von einer Beeinflussung der Epithelzelllinie HCE-T durch die Fibroblasten ausgehen. Letztere wurden von keiner der beiden Epithelzelllinien beeinflusst.

Aus Stabilitätsgründen haben Augentropfen oftmals keinen physiologischen pH-Wert von 7,4, sondern einen niedrigeren, da viele Arzneistoffe im Sauren stabiler sind ($pH < 5$). Trolle-Lassen (1958) hat bei Versuchen an Probanden festgestellt, dass Lösungen mit einem pH-Wert unter 5,8 in 99 % der Fälle eine Augenreizung verursachen, während dies bei Lösungen mit physiologischem pH nur bei 1 % der Fall ist. Aus diesem Grund wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, die nur den Einfluss des pH-Wertes auf die Zellvitalität berücksichtigte. Eine Verschiebung des

pH-Wertes aus dem euhydrischen Bereich von 7-9 führte zu Vitalitätsabnahmen bei den drei untersuchten cornealen Zelltypen. Dabei sank die Zellvitalität der Epithelzellen erst bei einem deutlichen Anstieg des pH-Wertes in basische Bereiche auf über 9, die der Endothelzellen bei Verschiebungen auf pH-Werte kleiner 7 und größer 8,5 und die Vitalität der Fibroblasten reagierte sehr sensibel auf kleinste Abweichungen vom physiologischen pH-Wert bei 7,4.

Neben der mitochondrialen Kapazität der Zellen wurde als zweiter Ansatz zur Bestimmung der Zytotoxizität die Membranintegrität der Zellen mittels Neutralrot-Test untersucht. Dieser Vergleich von MTT- und Neutralrot-Test für das Standardirritans SDS lieferte nahezu identische LC_{50} -Werte für die drei untersuchten Zelllinien. Auch bei den Zellvitalitäts-Konzentrations-Kurven waren keine größeren Unterschiede zu entdecken. Obwohl die beiden Tests an unterschiedlichen Strukturen der Zelle angreifen, findet man häufig Übereinstimmungen bei der Bestimmung des zytotoxischen Potentials von Substanzen [Borenfreund et al., 1988].

4.5 Zytotoxizitätsuntersuchungen am organotypischen humanen Cornea-Konstrukt

Die Bestimmung der Zytotoxizität von Substanzen mit Hilfe von Alternativmethoden ist oft mit Problemen verbunden, da viele Methoden relativ organfern konzipiert sind. Selbst die Zellkulturmethoden spiegeln nur selten die Verhältnisse in vivo wieder, da die Untersuchungen oftmals nur an Zellmonolayern durchgeführt werden. Dadurch werden die Wechselwirkungen der Zelltypen untereinander, wie sie in natürlichem Gewebe vorkommen, komplett außer Acht gelassen. Erste Versuche an Gewebeäquivalenten erfolgten dabei an Hautmodellen, die durch ihren mehrschichtigen Aufbau eine größere Ähnlichkeit zu den Verhältnissen in vivo zeigten, allerdings nicht aus cornealem Ursprungsgewebe stammten [Osborne et al., 1995]. Schneider (1996) gelang es erstmals ein dreidimensionales Cornea-Modell für Zytotoxizitätsuntersuchungen zu entwickeln. Die eingesetzten Zellen dieses Modells wurden aus Schweineföten gewonnen.

Da es noch kein bestehendes Modell mit humanen cornealen Zellen für Zytotoxizitätsuntersuchungen gibt, sollte daher untersucht werden, ob das organotypische Modell der humanen Cornea, welches sich bereits für Permeationsuntersuchungen bewährt hat, auch für diesen Zweck geeignet ist. Dafür wurden die Substanzen, die an den Monolayern der verwendeten Zellen vorab untersucht wurden (s. Abschnitt 4.4) sowohl an den fertigen humanen Cornea-Konstrukten als auch an den Konstrukt-Entwicklungsstufen getestet. Der Einfluss der Kultivierungsgrundlage und des Wachstumsmediums wurde ebenso untersucht. Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurden die morphologischen Veränderungen beobachtet, sowie der MTT- und der Neutralrot-Test durchgeführt. Die humanen Cornea-Konstrukte mit HCE-T-Epithel wurden bei den Zytotoxizitätsuntersuchungen, falls nicht anders angegeben, während der letzten beiden Stadien in Sasaki-Medium kultiviert.

4.5.1 Morphologische Veränderung der Cornea-Konstrukte durch Einwirkung von zytotoxischen Substanzen

Die Cornea-Konstrukte wurden nach 1-stündiger Exposition mit den Testsubstanzen wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben in ein Polymer eingebettet, geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Die Schnitte wurden im Mikroskop betrachtet und die morphologischen Veränderungen festgehalten.

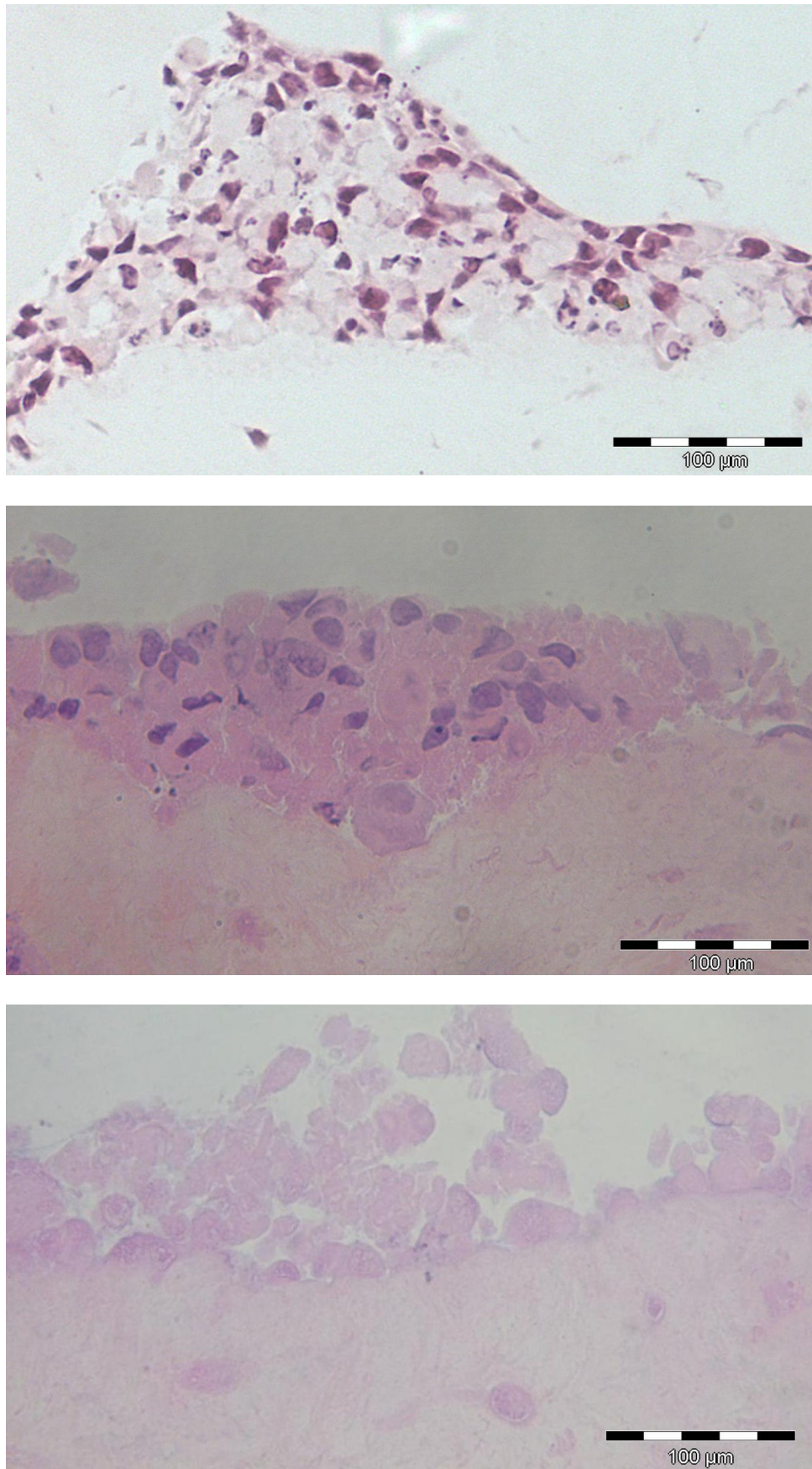


Abbildung 45: Querschnitt durch das Konstruktepithel (CEPI); unbehandelt (oben) und nach 1-stündiger Exposition mit SDS in halbletaler (170 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Mitte) und letaler Konzentration (640 $\mu\text{g}/\text{ml}$, unten)

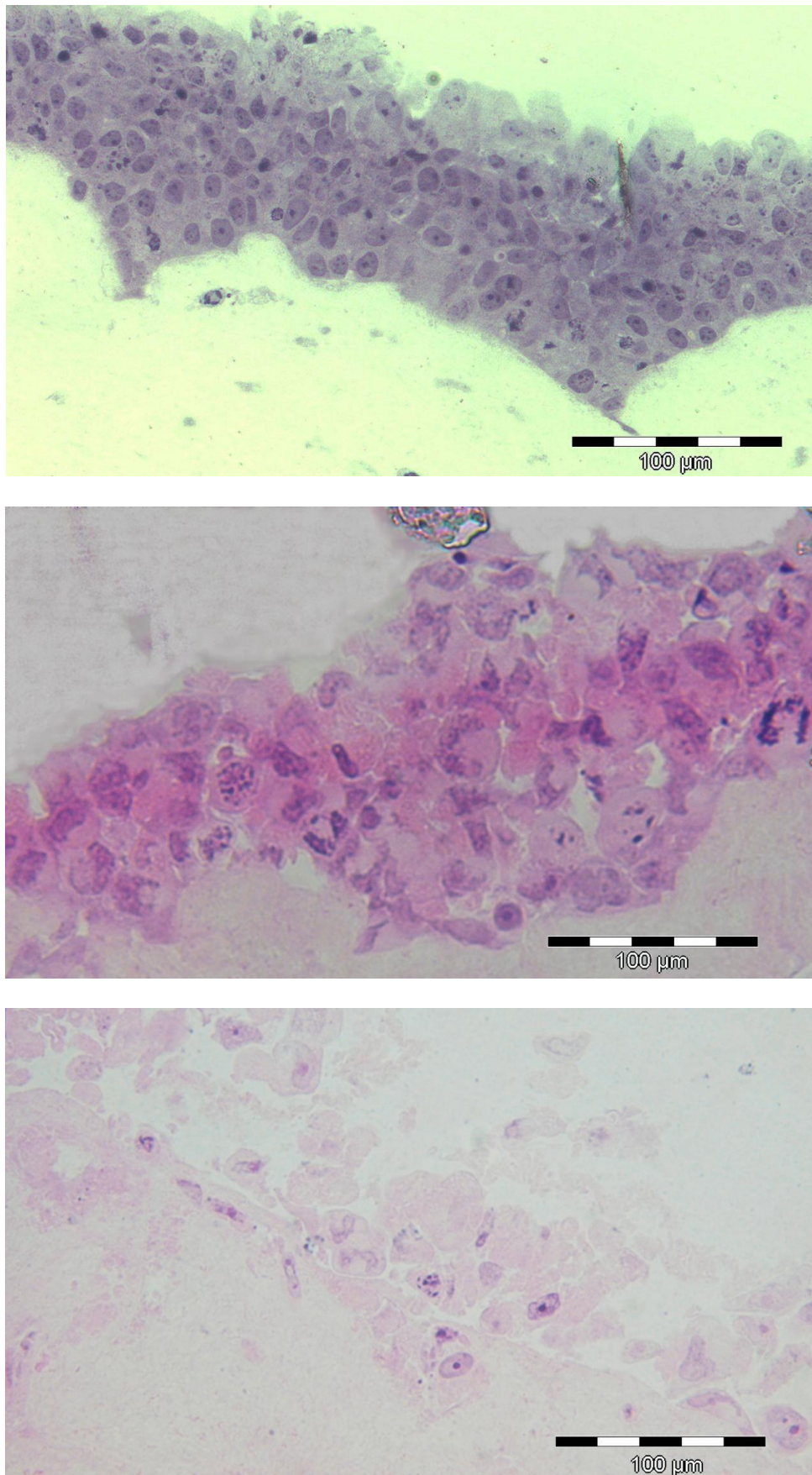


Abbildung 46: Querschnitt durch das Konstruktepithel (HCE-T); unbehandelt (oben) und nach 1-stündiger Exposition mit SDS in halbletaler (90 µg/ml, Mitte) und letaler Konzentration (640 µg/ml, unten)

In Abbildung 45 sind die Querschnitte des Cornea-Konstrukts mit CEPI-Epithel nach 1-stündiger Exposition mit SDS in halbletaler (170 µg/ml) und letaler (640 µg/ml) Konzentration im Vergleich zu einem unbehandelten Cornea-Konstrukt zu sehen. Bereits bei der halbletalen Konzentration sind deutlich weniger blau gefärbte Zellkerne als im unbehandelten Cornea-Konstrukt zu sehen. Stellenweise ist ein Auflösen der Zellmembran erkennbar. Bei der letalen Konzentration ist kein intakter Zellkern mehr zu sehen. Einige Zellen sind genau wie bei den Monolayerkulturen blasenartig aufgequollen, bei anderen hat sich die Zellmembran aufgelöst, so dass keine einzelnen Zellen mehr zu erkennen sind.

Die Abbildung 46 zeigt Cornea-Konstrukte mit HCE-T-Epithel nach 1-stündiger Exposition mit SDS in halbletaler (90 µg/ml) und letaler (640 µg/ml) Konzentration im Vergleich zum unbehandelten Konstrukt. Auch bei diesem Konstrukt-Typ tritt schon bei der halbletalen Konzentration vereinzelt Zelllyse auf, wobei die Oberflächenzellen am stärksten betroffen sind. Die Zahl der gefärbten Zellkerne ist ebenfalls vermindert, allerdings nicht ganz so deutlich wie bei den Konstrukten mit CEPI-Epithel. Eine Erklärung dafür liegt vermutlich in der niedrigeren Konzentration, die sich in Versuchen mit dem MTT-Test als LC₅₀-Wert herausgestellt hat (s. Abschnitt 4.5.2.1). Nach Behandlung mit einer letalen Konzentration von SDS sind die Zellen komplett zerstört, die Zellmembranen haben sich aufgelöst, und die Zellfragmente lösen sich deutlich von der Kollagenmatrix ab.

Die Schädigung der Zellen im Konstrukt kann anhand der morphologischen Veränderungen sehr gut verfolgt werden. Eine quantitative Bestimmung ist allerdings wie bei den Zellmonolayern schwierig, da durch einen Querschnitt immer nur ein Teil des Konstrukts betrachtet werden kann.

4.5.2 Vergleichende Untersuchungen zum zytotoxischen Potential ausgewählter Substanzen an den Cornea-Konstrukten mittels MTT-Test

4.5.2.1 Zytotoxizitätsuntersuchung von SDS am Cornea-Konstrukt

Als Standardirritans kam das anionische Tensid SDS zum Einsatz, das in den Monolayeruntersuchungen die geringsten halbletalen Konzentrationen und damit das größte schädigende Potential der verwendeten Substanzen aufwies.

Abbildung 47 zeigt das Vitalitäts-Konzentrations-Profil für das Modellirritans SDS gelöst in PBS am humanen Cornea-Konstrukt mit CEPI-Epithel im Vergleich zum

CEPI-Monolayer. Man erkennt eine deutlich höhere LC_{50} von 176 $\mu\text{g/ml}$ beim Konstrukt (Tabelle 12) als beim Zellmonolayer ($LC_{50} = 19,2 \mu\text{g/ml}$).

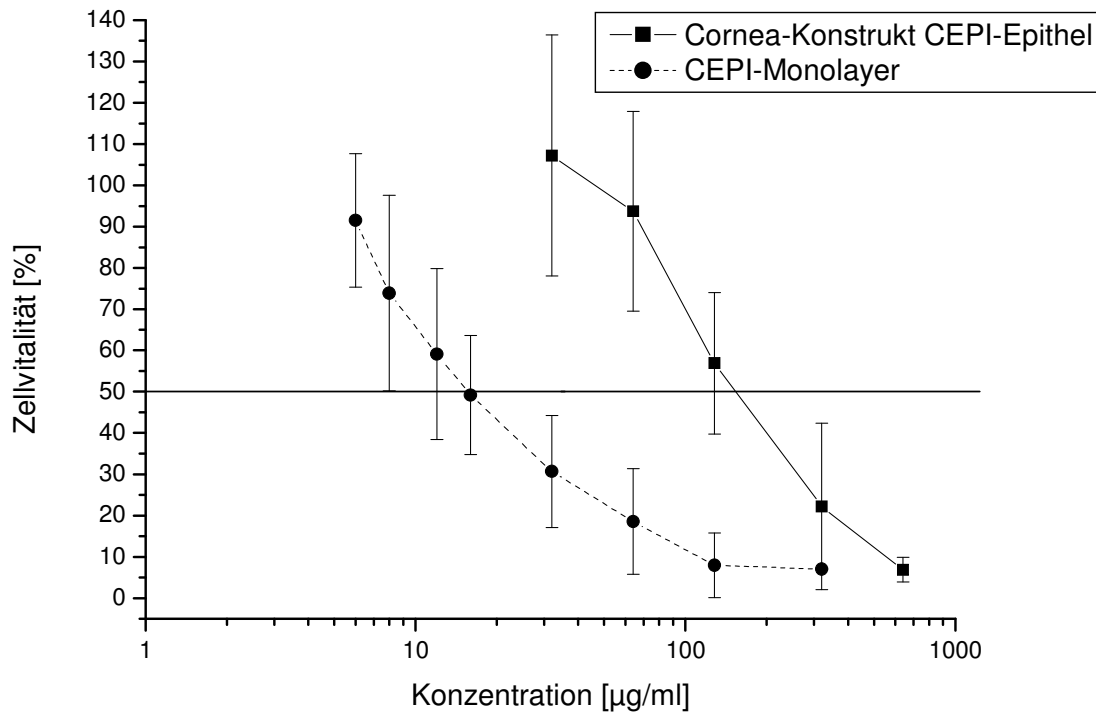


Abbildung 47: Zellvitalitäts-Konzentrations-Kurven für SDS in PBS vom humanen Cornea-Konstrukt mit CEPI-Epithel (n=10) und CEPI-Monolayer (n=6)

Die Zellvitalitäts-Konzentrations-Kurve des Cornea-Konstrukts verläuft komplett in einem höheren Konzentrationsbereich als die Kurve des Monolayers. Das humane Konstrukt mit CEPI-Epithel ist um den Faktor 9,5 unempfindlicher gegenüber SDS als der reine Zellmonolayer, die LC_{50} steigt um fast eine Zehnerpotenz.

Die Untersuchung wurde auch mit dem humanen Cornea-Konstrukt mit HCE-T-Epithel durchgeführt. Abbildung 48 zeigt die Zellvitalitäts-Konzentrations-Kurven für dieses Konstrukt im Vergleich zum HCE-T-Monolayer. Auch hier ist die halbletale Konzentration mit 88,7 $\mu\text{g/ml}$ größer als die des Monolayers mit 21,8 $\mu\text{g/ml}$, und die Zellvitalitäts-Konzentrations-Kurve verläuft in einem höheren Konzentrationsbereich. Allerdings ist der LC_{50} -Wert mit 88,7 $\mu\text{g/ml}$ für SDS nur etwa halb so groß, wie der des Konstrukts mit CEPI-Epithel, obwohl sich die beiden Epithelien in den Monolayeruntersuchungen nicht signifikant ($p > 0,05$) unterschieden haben (Tabelle 12).

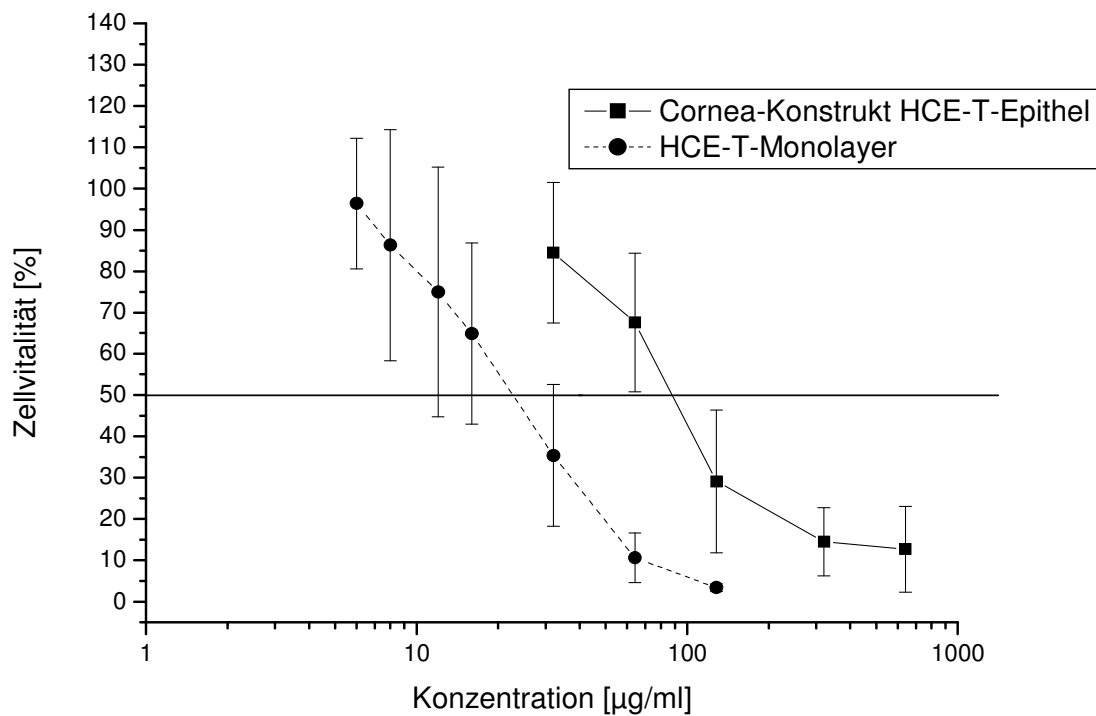


Abbildung 48: Zellvitalitäts-Konzentrations-Kurven für SDS in PBS vom humanen Cornea-Konstrukt mit HCE-T-Epithel (n=12) und HCE-T-Monolayer (n=5)

Tabelle 12: LC50-Werte für SDS in PBS an Monolayerkulturen und Cornea-Konstrukten; n=5-12; ★ ★ kennzeichnet Signifikanzen von $p < 0,01$

	HENC	HUFIB	CEPI	HCE-T	Signifikanz
SDS [µg/ml]	18,1 ± 5,1	14,9 ± 3,2	19,2 ± 8,1	21,8 ± 8,1	n.s.
	Konstrukt CEPI-Epithel		Konstrukt HCE-T-Epithel		
SDS [µg/ml]	176 ± 29,9		88,7 ± 19,3		★ ★

Insgesamt zeigen die Ergebnisse in Tabelle 12, dass beide humanen Cornea-Konstrukt-Typen deutlich unempfindlicher gegenüber SDS sind als die reinen Monolayer der cornealen Zelllinien.

4.5.2.2 Zytotoxizitätsuntersuchung von Diclofenac-Na, Clindamycin-HCl und Timolol-HM am Cornea-Konstrukt

Zur Überprüfung der Übertragbarkeit der mit SDS gefundenen Ergebnisse auf Arzneistoffe wurden die am Monolayer eingesetzten Substanzen Diclofenac-Na, Clindamycin-HCl und Timolol-HM ebenso an den beiden Konstrukt-Typen mit CEPI- und HCE-T-Epithel untersucht.

Die ermittelten LC_{50} -Werte für die Cornea-Konstrukte mit den beiden Epithelien sind in Abbildung 49 und in Tabelle 13 im Vergleich zu den Monolayerdaten der beiden Epithelzelllinien dargestellt.

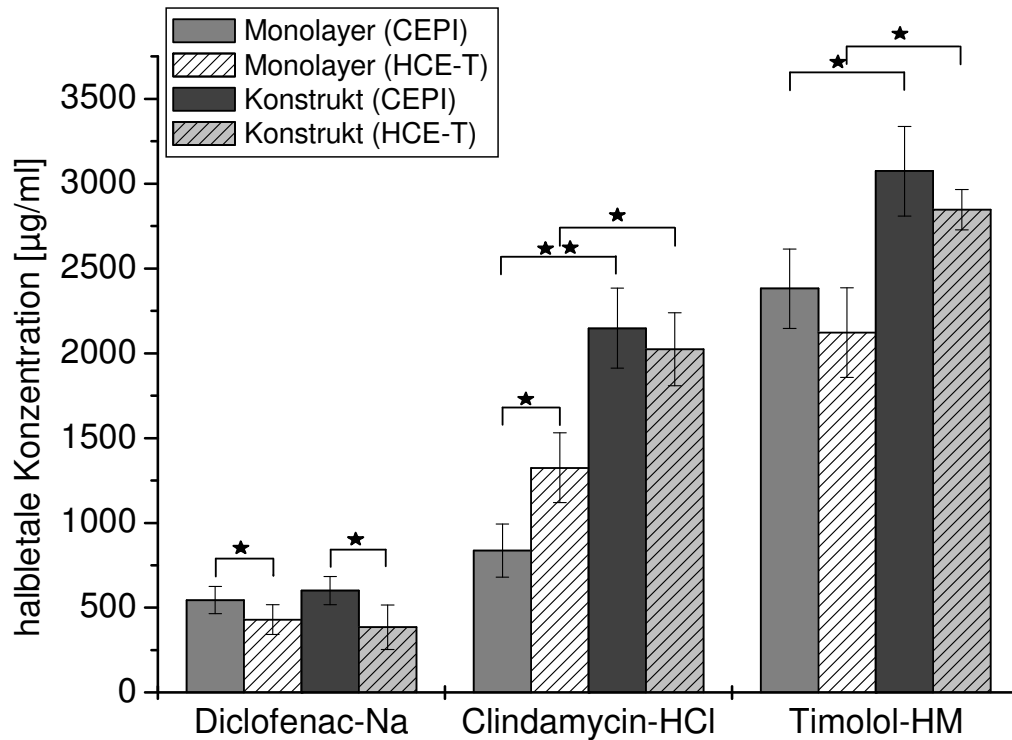


Abbildung 49: Vergleich der LC_{50} von Diclofenac-Na, Clindamycin-HCl und Timolol-HM für die Zellmonolayer der Zelllinien CEPI und HCE-T und den Konstrukten mit CEPI- und HCE-T-Epithel; n=3-12; ★ kennzeichnet Signifikanzen von $p < 0,05$; ★★ ($p < 0,01$)

Für den Arzneistoff Diclofenac-Na kann man keine signifikante ($p > 0,05$) Zunahme der halbletalen Konzentration beim Vergleich der Epithelmonolayer und der entsprechenden Konstrukte beobachten. Allerdings unterscheiden sich die beiden Epithelmonolayer (s. Abschnitt 4.4.2.2) und die beiden Konstrukt-Typen signifikant ($p < 0,05$) voneinander. Die LC_{50} -Werte für Diclofenac-Na befinden sich im Konzentrationsbereich zwischen 385-601 $\mu\text{g/ml}$. Das Cornea-Konstrukt mit HCE-T-Epithel ist mit 385 $\mu\text{g/ml}$ sogar am empfindlichsten gegenüber Diclofenac-Na.

Beim Clindamycin-HCl sieht man einen deutlichen Anstieg der LC_{50} -Werte für die Konstrukte gegenüber den Monolayerwerten um den Faktor 1,5-2,6. Der Unterschied zwischen dem Monolayer der Zelllinie CEPI und dem entsprechenden Konstrukt mit CEPI-Epithel ist sogar hoch signifikant ($p < 0,01$). Die halbletalen Konzentrationen liegen bei 2148 $\mu\text{g/ml}$ für das Cornea-Konstrukt mit CEPI-Epithel und 2024 $\mu\text{g/ml}$ für

das Konstrukt mit HCE-T-Epithel und unterscheiden sich nicht signifikant ($p > 0,05$). Auch beim Timolol-HM sind die LC_{50} -Werte der Konstrukte mit 3074 $\mu\text{g/ml}$ und 2847 $\mu\text{g/ml}$ signifikant ($p < 0,05$) höher als die der Zellmonolayer, allerdings ist der Unterschied mit Faktor 1,2-1,9 nicht ganz so deutlich wie beim Clindamycin-HCl. Tendenziell sind die Konstrukte mit HCE-T-Epithel bei allen untersuchten Substanzen empfindlicher als die Konstrukte mit CEPI-Epithel. Die Unterschiede sind allerdings nur beim Diclofenac-Na signifikant ($p < 0,05$). Vermutlich hängt dieses Verhalten ebenfalls mit der unzureichenden Kontraktion der Konstrukte mit HCE-T-Epithel zusammen, die schon in Abschnitt 4.2.2 beschrieben wurde.

Tabelle 13: LC_{50} -Werte von Diclofenac-Na, Clindamycin-HCl und Timolol-HM für die Cornea-Konstrukte mit CEPI- und HCE-T-Epithel und Bereiche der Monolayerdaten; $n=3-12$

	Diclofenac-Na [$\mu\text{g/ml}$]	Clindamycin-HCl [$\mu\text{g/ml}$]	Timolol-HM [$\mu\text{g/ml}$]
Zellmonolayer	425-544	837-1325	1637-2381
Konstrukt (CEPI)	601 \pm 83,4	2148 \pm 235	3074 \pm 264
Konstrukt (HCE-T)	385 \pm 131	2024 \pm 215	2847 \pm 118

4.5.2.3 Veränderung der Empfindlichkeit der Cornea-Konstrukte über die verschiedenen Entwicklungsstufen

Der Anstieg der halbletalen Konzentrationen bei 3 von 4 untersuchten Substanzen im Vergleich zum Monolayer kann vielfältige Gründe haben. Zur Erklärung der höheren Widerstandsfähigkeit wurden die Konstrukte in ihren unterschiedlichen Entwicklungsstufen in den Zytotoxizitätsuntersuchungen eingesetzt. Die LC_{50} -Werte der untersuchten Substanzen sind in Abbildung 50 über die 4-wöchige Kultivierungsdauer dargestellt.

Nach 7 Tagen Kultivierung bestand das Konstrukt aus einem Endothelmonolayer auf einem dünnen Kollagengel. Die halbletalen Konzentrationen der Substanzen (Tabelle 14) lagen erwartungsgemäß im selben Bereich wie die der Monolayeruntersuchungen. Eine leichte Erhöhung der LC_{50} trat beim SDS mit 32 $\mu\text{g/ml}$ im Vergleich zum HENC-Monolayer mit 18,1 $\mu\text{g/ml}$ und beim Diclofenac-Na mit 576 $\mu\text{g/ml}$ gegenüber 450 $\mu\text{g/ml}$ am HENC-Monolayer auf, der Unterschied war nur bei SDS signifikant ($p < 0,05$).

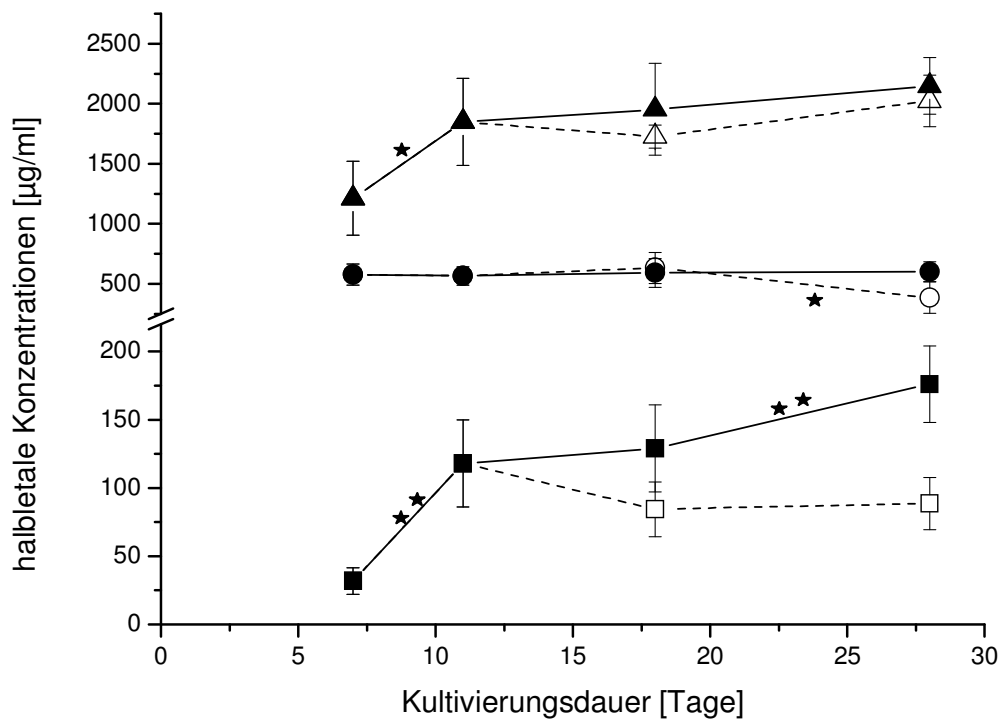


Abbildung 50: Verlauf der halbletalen Konzentrationen von SDS (■), Diclofenac-Na (●) und Clindamycin-HCl (▲) über die einzelnen Kultivierungsstadien der Konstrukte mit CEPI- (—) und HCE-T-Epithel (- - -); n=3-12; ★ kennzeichnet Signifikanzen von $p < 0,05$; ★★ ($p < 0,01$)

Tabelle 14: LC_{50} -Werte der eingesetzten Arzneistoffe in den Kultivierungsstadien der Konstrukte

Dauer der Kultivierung [Tage]	SDS [µg/ml]	Diclofenac-Na [µg/ml]	Clindamycin-HCl [µg/ml]
HENC-Monolayer	$18 \pm 5,1$	450 ± 123	1127 ± 200
7 (Bodengel + HENC)	$32 \pm 9,7$	576 ± 89	1212 ± 308
11 (BG, HENC + Fibroblasten-Matrix)	118 ± 32	564 ± 77	1848 ± 362
18 (BG, HENC, Fibr.-Matrix + CEPI, submers)	129 ± 32	591 ± 120	1953 ± 383
28 (BG, HENC, Fibr.-Matrix + CEPI, ALI)	176 ± 28	601 ± 83	2148 ± 235
18 (BG, HENC, Fibr.-Matrix + HCE-T, submers)	84 ± 20	633 ± 130	1726 ± 94
28 (BG, HENC, Fibr.-Matrix + HCE-T, ALI)	89 ± 19	385 ± 131	2024 ± 215

Das zweite Kultivierungsstadium, eine kontrahierte Kollagenmatrix mit inkorporierten cornealen Fibroblasten führte zu einem deutlichen Anstieg der LC_{50} um den Faktor 3,7 beim SDS auf eine Konzentration von 118 $\mu\text{g/ml}$ und um den Faktor 1,5 auf 1848 $\mu\text{g/ml}$ beim Clindamycin-HCl, während beim Diclofenac-Na mit einer LC_{50} von 564 $\mu\text{g/ml}$ keine signifikante ($p>0,05$) Veränderung der halbletalen Konzentration zu beobachten war.

Nach 18 Tagen Kultivierung unter submersen Bedingungen war das Konstrukt um einen Epithelmonolayer auf dem Stromaäquivalent erweitert. Das Epithel aus CEPI-Zellen führte bei SDS und Clindamycin-HCl noch einmal zu einem Anstieg der LC_{50} -Werte, allerdings nicht so stark, wie nach dem Hinzufügen der Kollagenmatrix mit den cornealen Fibroblasten zum Endothel auf dem Bodengel. Das Epithel aus HCE-T-Zellen sorgte hingegen für einen Abfall der halbletalen Konzentrationen bei diesen beiden Substanzen. Beim Diclofenac-Na blieben die LC_{50} -Werte im Bereich der vorhergehenden Untersuchungen.

In den letzten 10 Tagen der Kultivierung wurde das Cornea-Konstrukt an die Luft-Medium-Grenze (ALI) angehoben, um die Bildung eines mehrschichtigen Epithels zu induzieren. Beim Clindamycin-HCl führte dies bei beiden Epithelzelllinien zu einem leichten Anstieg der halbletalen Konzentrationen. Die LC_{50} -Werte für SDS stiegen beim Konstrukt mit CEPI-Epithel deutlich an, während sie beim Konstrukt mit HCE-T-Epithel gleich blieben. Die halbletale Konzentration von Diclofenac-Na veränderte sich bei den Konstrukten mit CEPI-Epithel wieder nicht, bei den Konstrukten mit HCE-T-Epithel konnte man einen Abfall der halbletalen Konzentration auf fast die Hälfte erkennen.

4.5.2.4 Einfluss der Kollagenmatrix auf die Widerstandsfähigkeit der Cornea-Konstrukte gegenüber SDS

Den größten Anstieg der halbletalen Konzentrationen bei der schrittweisen Untersuchung der Cornea-Konstrukte konnte man bei der Zugabe der Kollagenmatrix mit den inkorporierten cornealen Fibroblasten beobachten. Aus diesem Grund soll der Einfluss des Kollagens an dieser Stelle genauer betrachtet werden.

Dazu wurde auf den HENC-Monolayer eine Kollagenmatrix ohne inkorporierte Fibroblasten aufgebracht und für 4 Tage unter denselben Bedingungen wie das Cornea-Konstrukt kultiviert. Abbildung 51 zeigt einen Vergleich der beiden Zellvitalitäts-Konzentrations-Kurven mit und ohne Fibroblasten.

Das Kollagengel sorgte für eine gute Abschirmung der Endothelzellen, die bei der Matrix ohne Fibroblasten sogar noch besser war, insbesondere im Bereich niedriger SDS-Konzentrationen. Werden keine Fibroblasten in das Kollagengel eingearbeitet, kontrahiert es sich nicht und behält die Größe des Transwell-Einsatzes. Daher kann die SDS-Lösung in diesem Fall nur von oben auf das Konstrukt einwirken, während bei den kontrahierten fibroblastenhaltigen Konstrukten die SDS-Lösung auch von der Seite Kontakt zum Konstrukt hat. Die Abschirmung durch das kontrahierte Kollagengel ist nicht mehr so stark, sodass dadurch die Gele mit Fibroblasten gegenüber dem toxischen Agens empfindlicher sind.

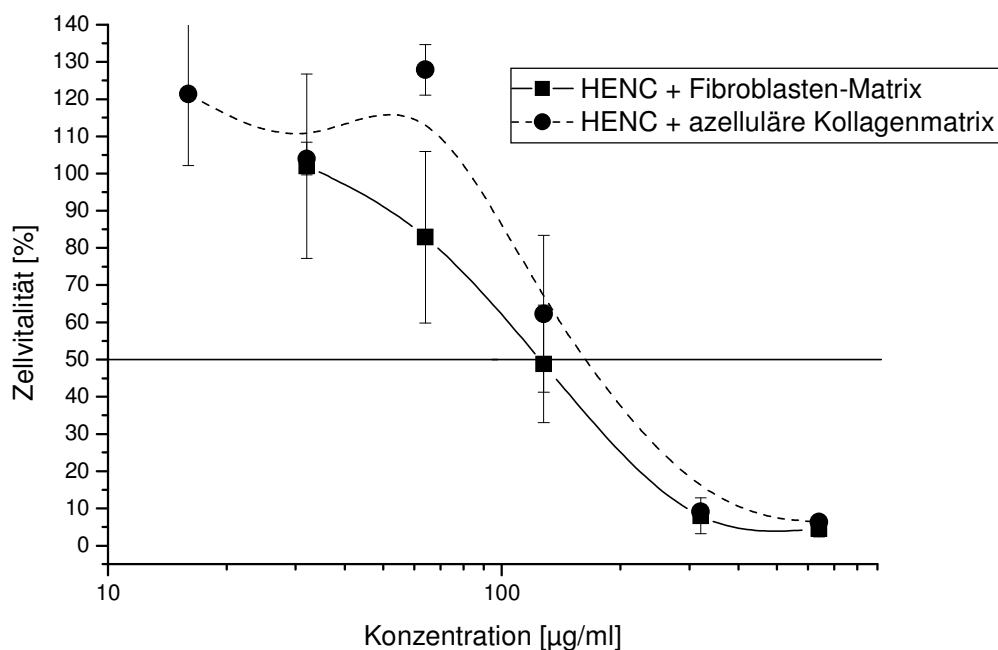


Abbildung 51: Vergleich der Zellvitalitäts-Konzentrations-Kurven von SDS an HENC-Monolayern mit aufgelagerter Kollagenmatrix mit und ohne Fibroblasten; $n=2-7$

4.5.2.5 Zytotoxizitätsuntersuchung an Cornea-Konstrukten kultiviert in verschiedenen Kultivierungsmedien

Das Kultivierungsmedium, in dem die Cornea-Konstrukte in den letzten 17 Tagen kultiviert werden, hat sowohl einen Einfluss auf den Durchmesser und die Festigkeit (s. Abschnitt 4.2.2) als auch auf die Permeationsbarriere der Konstrukte mit HCE-T-Epithel (s. Abschnitt 4.3.2). Aus diesem Grund sollte ein möglicher Einfluss des Kultivierungsmediums auf die Widerstandsfähigkeit der Cornea-Konstrukte gegenüber SDS ebenso untersucht werden.

Die Cornea-Konstrukte mit CEPI-Epithel zeigten wie in Abschnitt 4.5.2.1 beschrieben mit 176 $\mu\text{g/ml}$ für SDS einen deutlich höheren LC_{50} -Wert, als die Konstrukte mit HCE-T-Epithel mit 88,7 $\mu\text{g/ml}$. Werden letztere in CEPI-Wachstumsmedium kultiviert, steigt die halbletale Konzentration von SDS leicht auf 112 $\mu\text{g/ml}$ an, die Widerstandsfähigkeit der Konstrukte steigt also. Abbildung 52 zeigt die halbletalen Konzentrationen für die drei Konstrukt-Typen im Vergleich. Dabei wird deutlich, dass der Unterschied zwischen den beiden unterschiedlich kultivierten Cornea-Konstrukten mit HCE-T-Epithel nicht signifikant ist ($p > 0,05$).

Die Empfindlichkeit der Konstrukte mit HCE-T-Epithel gegenüber SDS wird also durch das Kultivierungsmedium nicht beeinflusst.

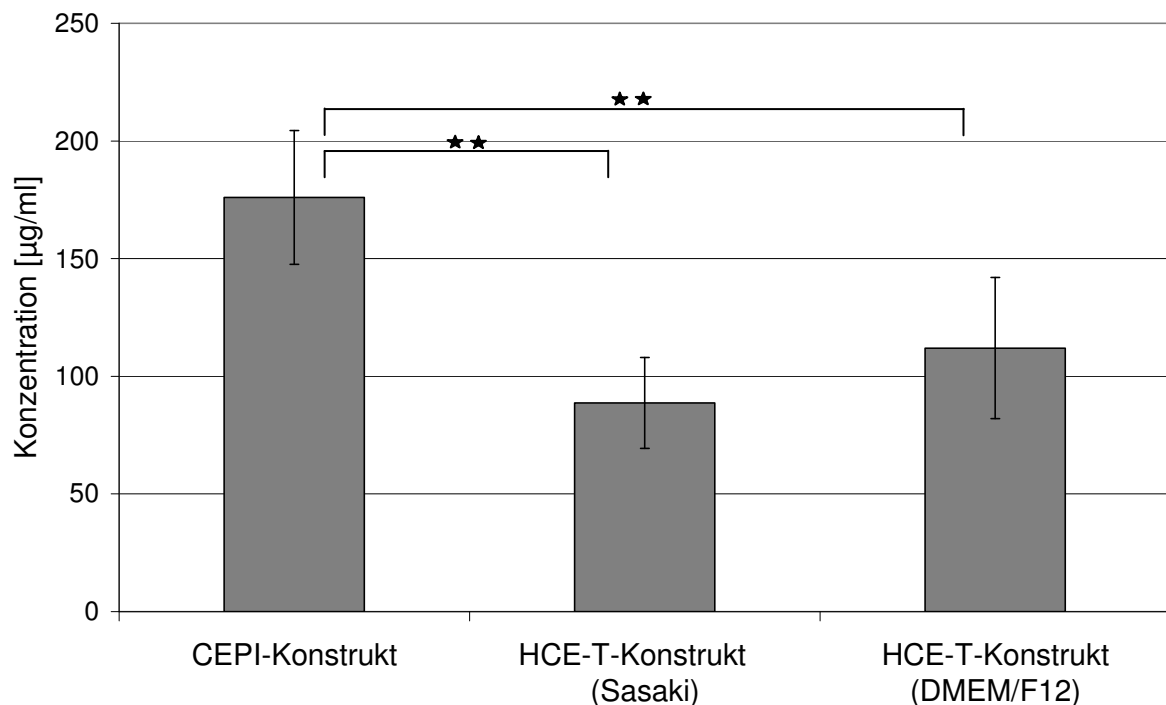


Abbildung 52: Halbletale Konzentration von SDS für Cornea-Konstrukte mit HCE-T-Epithel in unterschiedlichen Kultivierungsmedien und mit CEPI-Epithel; $n=6-12$; ★ kennzeichnet Signifikanzen von $p < 0,05$; ★★ ($p < 0,01$)

4.5.3 Vergleichende Zytotoxizitätsuntersuchungen an Cornea-Konstrukten mittels Neutralrot-Test

Der Neutralrot-Test hat in den Monolayeruntersuchungen eine gute Übereinstimmung mit dem MTT-Test für das schädigende Potential von SDS an den verschiedenen Zelllinien gezeigt. Ob diese Ergebnisse auf die Untersuchungen am

Cornea-Konstrukt übertragbar sind, und ob es dort wie mit dem MTT-Test auch zu einem starken Anstieg der halbletalen Konzentration von SDS kommt, sollte die folgende Versuchsreihe zeigen.

In Abbildung 53 sind die Kurven der Zellvitalitäten der Konstrukte nach Behandlung mit SDS zu sehen. Während beim MTT-Test mit steigender SDS-Konzentration eine Abnahme der Zellvitalität bis nahezu 0 % beobachtet werden konnte, blieb die Zellvitalität beim Neutralrot-Test konstant und stieg bei hohen Konzentrationen sogar noch leicht an. Eine halbletale Konzentration konnte im eingesetzten Konzentrationsbereich nicht ermittelt werden. Auch der Einsatz deutlich höherer SDS-Konzentrationen führte nicht zu einem Abfall der Kurve.

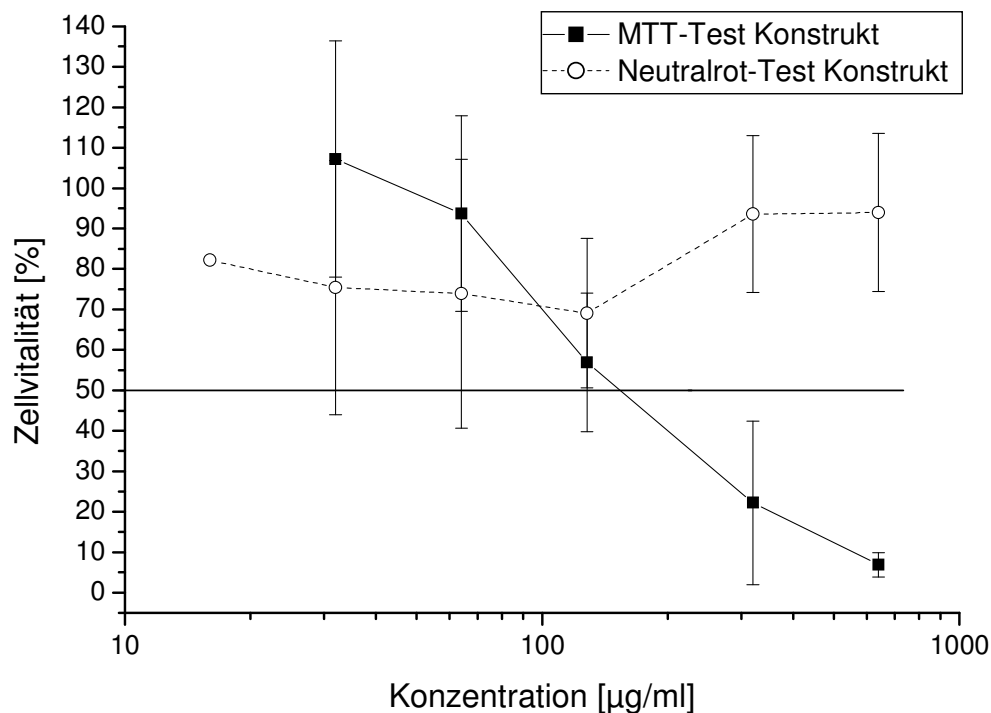


Abbildung 53: Vergleich der Zellvitalitäts-Konzentrations-Kurven von SDS an Cornea-Konstrukten ermittelt mit MTT- und Neutralrot-Test; n=2-10

Da nicht davon auszugehen ist, dass SDS als Tensid die Zellen schädigt ohne die Zellmembran zu beeinflussen, und die Monolayeruntersuchungen dies auch bestätigten, muss das Neutralrot durch einen anderen Faktor während des Versuchs gebunden werden. Da dafür nur die Kollagenmatrix des Stromas in Frage kommen kann, wurden azelluläre Kollagengele mittels Neutralrot untersucht. Die Gele zeigten nach der Inkubationszeit eine Rotfärbung, die sich auch durch mehrmaliges

Waschen mit PBS nicht entfernen ließ. Der kationische Farbstoff Neutralrot wird vermutlich in den anionischen Bereichen der Kollagenmatrix gebunden und erst nach Behandlung mit der essigsäurehaltigen Entwicklungslösung, die auch die Kollagenmatrix auflöst, wieder freigegeben.

Der Neutralrot-Test ist also durch die Inkompatibilität zwischen Neutralrot und der Kollagenmatrix für Untersuchungen am Cornea-Konstrukt nicht geeignet. Der MTT-Test hingegen verursacht keine messbare Blaufärbung bei der Inkubation mit einem azellulären Kollagengel und verfälscht daher das Messergebnis nicht.

4.5.4 Zusammenfassende Diskussion zu den vergleichenden Untersuchungen zum zytotoxischen Potential ausgewählter Substanzen an Cornea-Konstrukten

Die Zellvitalitätsbestimmungen an den humanen Cornea-Konstrukten mit CEPI- und HCE-T-Epithel sollten zeigen, ob die Zellkulturmodelle nicht nur für Permeations-experimente, sondern auch für Zytotoxizitätsuntersuchungen geeignet sind.

Bei den Cornea-Konstrukten ließ sich die Schädigung der Zellen durch zytotoxische Substanzen nach Anfertigen von Schnittpräparaten mit anschließender Färbung erkennen. Die Zahl der intakten Zellkerne im Bereich des Epithels war bereits bei der halbletalen Konzentration einer toxischen Substanz gegenüber der Zahl im unbehandelten Konstrukt deutlich reduziert. Bei letaler Konzentration waren praktisch keine lebenden Zellkerne mehr zu erkennen, und die Zellen zeigten analog zu den Monolayerkulturen eine Quellung mit daraus resultierender Lyse der Zellmembran. Die Gewebestrukturen waren aufgelöst und das ehemals dicht gepackte Epithel bestand nur noch aus agglomerierten Zellfragmenten, es löste sich deutlich von der stromalen Kollagenmatrix ab.

Für das Standardirritans SDS konnten deutlich höhere LC_{50} -Werte an den humanen Cornea-Konstrukten im Vergleich zu den Monolayern der einzelnen Zelllinien ermittelt werden. Für SDS ergab sich an den Konstrukten mit CEPI-Epithel eine um den Faktor 9,5 höhere LC_{50} als an den Zellmonolayern. Bei den Konstrukten mit HCE-T-Epithel war der Unterschied mit Faktor 4,8 zu den Monolayeruntersuchungen etwas geringer, aber immer noch deutlich. Diese geringere Empfindlichkeit der Cornea-Konstrukte gegenüber SDS im Vergleich zu Zellmonolayern konnte Schneider (1996) bereits an fetalen porcinen Cornea-Konstrukten beobachten.

Ob diese Ergebnisse auf weitere Substanzen übertragbar sind, sollten Untersuchungen mit den Arzneistoffen Diclofenac-Na, Clindamycin-HCl und Timolol-HM zeigen. Eine Empfindlichkeitsabnahme der Cornea-Konstrukte gegenüber den Zellmonolayern konnte für Clindamycin-HCl und Timolol-HM beobachtet werden. Die halbletalen Konzentrationen waren allerdings beim Clindamycin-HCl nur um den Faktor 1,5-2,6 und beim Timolol-HM nur um den Faktor 1,2-1,9 höher als die der Monolayeruntersuchungen. Beim Diclofenac-Na lagen die LC_{50} -Werte der Konstrukte knapp ober- und unterhalb der ermittelten Monolayerdaten. Man kann also nicht von einer generellen Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber schädigenden Substanzen ausgehen sondern nur von substanzspezifischen Unterschieden.

Die Gründe für die starke Zunahme der halbletalen Konzentration und damit der Widerstandsfähigkeit der Cornea-Konstrukte für einige Substanzen sollten anhand von Zytotoxizitätstests an den einzelnen Kultivierungsstadien der Konstrukte ermittelt werden. Während es bei der ersten Entwicklungsstufe, dem Endothelmonolayer auf einem Kollagengel zu keinem signifikanten Anstieg der LC_{50} -Werte im Vergleich zum Monolayer kam, führte das Hinzufügen der Kollagenmatrix mit den cornealen Fibroblasten zu einer starken Zunahme der Widerstandsfähigkeit gegenüber SDS und Clindamycin-HCl. Nach Erweiterung des Cornea-Konstrukts um einen Epithelmonolayer sank die Empfindlichkeit der Konstrukte mit CEPI-Epithel für beide Substanzen weiterhin leicht ab. Im Gegensatz dazu stieg sie bei den Konstrukten mit HCE-T-Epithel etwas an. Das letzte Stadium der Kultivierung bestand aus dem Heraufsetzen der Konstrukte an die Luft-Medium-Grenze, um die Bildung eines mehrschichtigen Epithels zu induzieren. Die Konstrukte mit CEPI-Epithel reagierten auf diesen Entwicklungsschritt mit einer weiteren Zunahme der Widerstandsfähigkeit gegenüber SDS und Clindamycin-HCl. Das Verhalten der Konstrukte mit HCE-T-Epithel war hingegen nicht einheitlich. Beim SDS blieb der LC_{50} -Wert konstant, beim Clindamycin-HCl stieg er leicht an und beim Diclofenac-Na, das sonst keinerlei Veränderungen in seiner zytotoxischen Wirkung bei den einzelnen Kultivierungsstadien zeigte, fiel er ab.

Der deutliche Anstieg der halbletalen Konzentration von SDS beim Aufbringen der stromalen Kollagenmatrix konnte auch mit einem azellulären Kollagengel erreicht werden. Ohne Fibroblasten kontrahiert sich das Kollagengel nicht, es kommt zu einer mechanischen Abschirmung des Endothels, und das toxische Agens erreicht die Zellen schlechter. Des Weiteren wird SDS wahrscheinlich im Kollagengel gebunden,

da es sich beim Kollagen um Proteine handelt, und SDS bereits bei den Versuchen mit serumhaltigen Medien eine deutlich geringere Toxizität gezeigt hat.

Der Einfluss des Kultivierungsmediums zeigte sich bereits in unterschiedlichen Größen und Festigkeiten der Konstrukte sowie in ihren Barriereigenschaften. Eine Veränderung der LC_{50} -Werte für SDS und somit der Empfindlichkeit der Konstrukte konnte beim Wechsel des Kultivierungsmediums bei den Konstrukten mit HCE-T-Epithel allerdings nicht beobachtet werden.

Da es zu Wechselwirkungen des kationischen Farbstoffs Neutralrot mit der Kollagenmatrix kam, und somit kein Zusammenhang mehr zwischen Farbintensität und Zellvitalität bestand, eignet sich der Neutralrot-Test als Alternativmethode nicht zur Zellvitalitätsbestimmung bei den Cornea-Konstrukten.

Insgesamt zeigten die Untersuchungen, dass die organotypischen humanen Cornea-Konstrukte für Zytotoxizitätsuntersuchungen mit dem MTT-Test gut geeignet sind und konzentrationsabhängige Veränderungen durch toxische Agentien auch in ihrer Morphologie dargestellt werden können.

5 Abschlussdiskussion

5.1 Kultivierung und Charakterisierung der humanen cornealen Zellen

Die in dieser Arbeit eingesetzten humanen Cornea-Konstrukte bestehen aus den drei Zellarten der Cornea - den Endothelzellen, den Fibroblasten und den Epithelzellen. Eingesetzt wurden dabei die immortalisierte Endothelzelllinie HENC, die immortalisierten Epithelzelllinien CEPI und HCE-T, sowie native corneale Fibroblasten. Für die weiterführenden Untersuchungen an den Cornea-Konstrukten war es notwendig zuerst das Ausgangszellmaterial zu charakterisieren. Die typischen Merkmale der Corneazellen sollten in Kultur auch über viele Passagen möglichst erhalten bleiben.

Die immortalisierten HENC- und CEPI-Zelllinien befinden sich bereits seit 8 Jahren in unserem Institut in Kultur, und die nativen Fibroblasten werden regelmäßig aus scleralen Ringen humaner Spenderhornhäute isoliert. Als neue Zelllinie wurden die HCE-T-Zellen in Kultur genommen, die eine gut verfügbare und gut charakterisierte immortalisierte Epithelzelllinie sind und die als Alternative zum CEPI-Epithel in den Konstrukten etabliert werden sollten.

Die Morphologie der eingesetzten Zelllinien war charakteristisch für den jeweiligen Zelltyp und änderte sich im Verlauf der Kultivierung nicht. Auch unterschiedliche Chargen der isolierten cornealen Fibroblasten zeigten keine morphologischen Unterschiede.

Die submerse Kultivierung der Zellen führt in der Regel nicht zur Bildung von mehrschichtigen Zellverbänden. Bei den beiden Epithelzelllinien CEPI und HCE-T konnten jedoch vereinzelt Zellcluster beobachtet werden, wenn die Kultur über den Punkt der Konfluenz hinaus kultiviert wurde. Das Auftreten solcher Zellcluster war ein Anzeichen für ein baldiges Absterben der gesamten Kultur, da der Platz für eine weitere Zellvermehrung fehlte, und es zu einer Kontaktinhibition kam.

Um das Wachstumsverhalten der Kulturen näher beschreiben zu können, wurden Wachstumskurven aufgezeichnet, die Populationsverdopplungszeit und die Sättigungsdichte als Kennzahlen für den Zustand der Kulturen bestimmt. Alle vier Zelllinien zeichneten sich durch eine hohe Proliferationsrate in Kultur aus. Die beiden immortalisierten Epithelzelllinien CEPI und HCE-T zeigten ein ähnliches exponentielles Wachstum bis zur Konfluenz und die höchsten Sättigungsdichten der untersuchten Zelllinien. Das Wachstum der immortalisierten Endothelzelllinie HENC

war etwas langsamer als das der Epithelzelllinien, die Sättigungsdichte erreichte jedoch ebenso hohe - für immortalisierte Zellen typische - Werte. Erwartungsgemäß zeigten die nativen cornealen Fibroblasten das langsamste Wachstum und eine um eine Zehnerpotenz geringere Sättigungsdichte.

Das morphologische Erscheinungsbild und die Wachstumscharakteristika blieben bei den immortalisierten Zelllinien auch bei hohen Passagen konstant, nur die nativen cornealen Fibroblasten zeigten ab Passage 12 Alterungserscheinungen, wie z. B. ein deutlich verlangsamtes Wachstum und eine Veränderung ihrer Gestalt.

5.2 Aufbau und Charakterisierung der humanen Cornea-Konstrukte mit zwei unterschiedlichen Epithelzelllinien

Ausgehend von den Untersuchungen zum Aufbau eines organotypischen humanen Cornea-Äquivalents [Germain et al, 1999; Reichl et al., 2004] wurden zwei Cornea-Konstrukt-Modelle mit unterschiedlichen Epithelien aufgebaut. Die Verwendung aller drei Zellarten der Cornea sollte bewirken, dass sich die Zellen in ihrer morphologischen Anordnung und in ihrem Differenzierungsverhalten analog zu den Bedingungen in vivo verhalten [Zieske et al., 1994].

Die histologischen Schnittpräparate zeigten eine ähnliche Struktur der Cornea-Konstrukte im Vergleich zur exzidierten humanen Cornea. Die Zahl der Epithelzellschichten war bei den beiden Modellen und dem Originalgewebe annähernd gleich, lediglich die Differenzierung in Basal-, Flügel- und Oberflächenzellen konnte bei den Cornea-Konstrukten nicht beobachtet werden. Ein weiterer Unterschied lag in der unregelmäßigen Oberfläche der Konstrukt-Epithelien im Vergleich zur glatten, gleichmäßigen Oberfläche der humanen Cornea. Dies hängt mit dem fehlenden Tränenfilm und Lidschlag zusammen, die die Oberfläche der Cornea wie ein Scheibenwischer säubern und glätten [Leydhecker, 1990]. Ein Vergleich der mehrschichtigen Epithelien der beiden Cornea-Konstrukt-Typen lässt darüber hinaus ein nahezu identisches Erscheinungsbild der beiden unterschiedlichen Epithelzelllinien im Gewebeverbund erkennen.

Mit der üblichen Kultivierung unter submersen Bedingungen ist die Ausbildung mehrschichtiger Epithelien nicht möglich. Damit die Epithelzellen zu einem mehrschichtigen Wachstum angeregt werden, ist es nötig die Konstrukte an die Luft-Medium-Grenze anzuheben [Reichl 2003] und sie auf einer fibroblastenhaltigen Matrix zu kultivieren [Tegtmeyer, 2000]. Als geeignete Matrix hat sich für die

Kultivierung ein Kollagengel mit darin eingebetteten cornealen Fibroblasten erwiesen. Die Fibroblasten kontrahieren in Abhängigkeit von der Kollagenkonzentration bzw. ihrer Zellzahl das Gel [Bell et al., 1979] und demonstrieren so ihre Lebensfähigkeit im Kollagen. Anhand der Kontraktion konnte man auch Qualitätsunterschiede zwischen den Konstrukten ausmachen. Die Cornea-Konstrukte mit HCE-T-Epithel hatten nach Ende der Kultivierung einen deutlich größeren Durchmesser als die Konstrukte mit CEPI-Epithel, obwohl bei beiden die gleiche Menge an Fibroblasten und Kollagen eingesetzt wurde. Der Grund für diese schlechtere Kontraktion war das Kultivierungsmedium der HCE-T-Zelllinie, das auch für die Kultivierung der Cornea-Konstrukte mit HCE-T-Epithel ab Tag 11 eingesetzt wurde. Mit DMSO und Choleratoxin enthielt es zwei Substanzen, die das Fibroblastenwachstum hemmen. Durch eine Kultivierung der Cornea-Konstrukte mit HCE-T-Epithel im Kultivierungsmedium der CEPI-Zelllinie konnte wieder eine stärkere Kontraktion der Konstrukte erreicht werden, wobei der Durchmesser sowie die Festigkeit der Konstrukte noch geringer als mit CEPI-Epithel waren.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen das bereits bestehende humane Cornea-Konstrukt mit CEPI-Epithel weiterzuführen und durch den Austausch der Epithelzelllinie mit HCE-T-Zellen ein weiteres Modell zu etablieren.

5.3 Vergleichende Permeationsuntersuchungen mit exzidiierter humaner Cornea und den Cornea-Konstrukten mit zwei unterschiedlichen Epithelzelllinien

Die Untersuchungen zur Permeation von ausgewählten Arzneistoffen wurden an den beiden Cornea-Konstrukt-Modellen durchgeführt und diese Ergebnisse untereinander und mit Permeationsdaten von exzidierten humanen Spenderhornhäuten verglichen. Die drei Beispiel-Arzneistoffe Timolol-HM, Diclofenac-Na und Clindamycin-HCl besitzen unterschiedliche physikochemische Eigenschaften und wurden zur besseren Vergleichbarkeit alle in einer 0,5%igen wässrigen Lösung eingesetzt.

Bei Verwendung der humanen Cornea-Konstrukte mit CEPI-Epithel ließ sich bei allen drei Arzneistoffen eine nahezu identische Permeabilität der Konstrukte im Vergleich zur exzidierten humanen Cornea feststellen. Dabei zeigte sich beim Vergleich der Permeationskoeffizienten für die Arzneistoffe Timolol-HM und Diclofenac-Na ein Faktor von 1,0 und für Clindamycin-HCl ein Faktor von 0,9, was auf identische Barriereigenschaften der Cornea-Konstrukte mit CEPI-Epithel und exzidiierter

humaner Cornea hindeutet. Eine ebenso gute Übereinstimmung konnten Reichl et al. (2005) auch für die Arzneistoffe Pilocarpin-HCl, Befunolol-HCl und Hydrocortison in ergänzenden Untersuchungen zeigen.

Eine erhöhte Durchlässigkeit der Konstrukte, die in vorangegangenen Untersuchungen von Tegtmeyer et al. (2001, 2004) und Reichl et al. (2001, 2003, 2004) beschrieben wurde, ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die exzidierten Hornhäute von anderen Spezies, wie Rind oder Schwein stammten und sich diese in ihrer Morphologie und der Dicke des Epithel deutlich von der humanen Cornea unterscheiden. Das humane Gewebe besteht aus 4-5 epithelialen Schichten, während beim Rind und beim Schwein 5-8 Zellschichten zu erkennen sind, die zu einer Erhöhung der Permeationsbarriere führen.

Um zu untersuchen inwieweit sich der Austausch der Epithelzelllinie CEPI gegen die Epithelzelllinie HCE-T auf die Permeationsbarriere auswirkt, wurden identische Permeationsexperimente an den modifizierten Cornea-Konstrukten vorgenommen und mit den Permeationsdaten der exzidierten humanen Cornea und des Konstrukts mit CEPI-Epithel verglichen. Die Epithelzelllinie HCE-T besitzt die Fähigkeit besonders dichte „tight junctions“ auszubilden [Toropainen et al., 2001], was auf gute Barriereigenschaften des entstehenden Epithels hindeutet.

Für das hydrophile Timolol-HM konnte diese Vermutung auch bestätigt werden. Die Konstrukte mit HCE-T-Epithel zeigten eine um den Faktor 0,4 geringere Permeabilität gegenüber den Konstrukten mit CEPI-Epithel und der exzidierten Cornea. Beim Diclofenac-Na, das als lipophiler Arzneistoff hauptsächlich auf dem transzellulären Weg durch das Gewebe permeiert, waren die Permeationskoeffizienten für die humane Cornea und die Konstrukte mit CEPI- und HCE-T-Epithel nahezu identisch. Das gleiche Ergebnis wurde auch bei Clindamycin-HCl erhalten, obwohl es polarer ist als Diclofenac-Na und damit eine geringere Permeabilität bei den Konstrukten mit HCE-T-Epithel im Vergleich zu den Konstrukten mit CEPI-Epithel zu erwarten war. Clindamycin-HCl hat einen niedrigeren pKs-Wert von 7,6 als Timolol-HM mit pKs=8,8. Daher liegt beim physiologischen pH-Wert 7,4 im Cornea-Konstrukt ein größerer Anteil an undissoziiertem Clindamycin als an undissoziiertem Timolol vor. Das Clindamycin kann dadurch sowohl parazellulär als auch zu einem höheren Anteil transzellulär durch das Gewebe permeieren. Die humanen Cornea-Konstrukte mit HCE-T-Epithel zeigten erwartungsgemäß eine bessere Barrierefunktion gegenüber

hydrophilen Substanzen und eine gleichwertige Permeationsbarriere für lipophile Substanzen im Vergleich zu den Cornea-Konstrukten mit CEPI-Epithel.

Ein großes Problem bei den Permeationsuntersuchungen an den Cornea-Konstrukten mit HCE-T-Epithel war die nur geringe Kollagenkontraktion der Stromalen Matrix. Die Konstrukte hatten nicht nur einen deutlich größeren Durchmesser, sie waren auch dünner und fragiler als die Konstrukte mit CEPI-Epithel. Eine Verbesserung konnte man durch den Austausch des Kultivierungsmediums in den letzten 2 Wochen der Kultivierung erzielen. Die Cornea-Konstrukte mit HCE-T-Epithel, die mit DMEM/F12-Medium, dem Wachstumsmedium der CEPI-Zellen kultiviert wurden, waren kleiner und fester. Die Permeationsbarriere für Timolol-HM und Clindamycin-HCl veränderte sich durch diese modifizierte Kultivierung nicht. Nur beim Diclofenac-Na kam es zu einer starken Abnahme der Permeationsbarriere, die jedoch nicht zweifelsfrei mit der Umstellung des Mediums erklärt werden konnte, da Adaptionsprobleme der HCE-T-Zellen an das „fremde“ Wachstumsmedium auch bei den anderen Arzneistoffen zu Veränderungen der Permeationsbarriere hätten führen müssen.

5.4 Vergleichende Zytotoxizitätsuntersuchungen an den unterschiedlichen Cornea-Zellarten

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand mehrerer Methoden die zytotoxische Wirkung verschiedener Stoffe auf Zellmonolayer und humane Cornea-Konstrukte bestimmt. Eine Zytotoxizität kann durch die Beeinflussung verschiedener Zellbestandteile ausgelöst werden. Die wichtigsten Angriffspunkte für toxische Agentien sind die Zellmembranen, das Redoxpotential, die ATP- und Makromolekülsynthese, sowie die DNA [Schwarz, 1996]. Zur Bestimmung der Zellvitalität stehen zahlreiche Methoden zur Verfügung, die entweder spezielle physiologische Leistungen lebender Zellen [Mosman, 1983; Borenfreund et al., 1988] oder die Membranintegrität [Borenfreund und Puerner, 1985, 1985a] messen. Als zusätzliches Instrument zur Untersuchung der Zytotoxizität dient die Beobachtung morphologischer Veränderungen der Zellen [Bhatia und Yetter, 2008]. In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Methoden verwendet, bei denen die oben erwähnten drei Nachweisprinzipien zur Bestimmung der Toxizität an den Zellen genutzt wurden.

Um zu Beginn der Untersuchungen eine grobe Einschätzung über das zytotoxische Potential von Substanzen zu erlangen, wurden die morphologischen Veränderungen der Zellen beobachtet. Bereits ab einer halbletalen Konzentration waren abgerundete Zellen und Lücken im Zellrasen zu erkennen. Im Bereich der letalen Konzentration nahm die Zahl der noch intakten Zellen deutlich ab, und der überwiegende Teil der Population hatte sich von der Kultivierungsfläche abgelöst und ein blasenartiges Aussehen angenommen. Dass die morphologischen Zellveränderungen gut mit Daten aus anderen Zytotoxizitätsuntersuchungen korrelieren, konnten mehrere Studien zeigen [Grant et al., 1992; Gueniche und Ponec, 1993; Bhatia und Yetter, 2008]. Allerdings ist die Methode im Bereich geringerer bis mittlerer Schädigung zu ungenau und daher nicht zur Quantifizierung von halbletalen Konzentrationen geeignet.

Zur Beurteilung der physiologischen Leistung der Zelle kann unter anderem das mitochondriale Reduktionsvermögen der Zellen herangezogen werden. Für die Untersuchung dieses Vitalitätsmerkmals wurde in dieser Arbeit der MTT-Test durchgeführt, bei dem ein Tetrazoliumsalz durch die mitochondrialen Dehydrogenasen in ein farbiges Formazan umgewandelt wird, welches dann photometrisch erfasst werden kann. Für die eingesetzten Substanzen SDS, Diclofenac-Na, Clindamycin-HCl und Timolol-HM konnten jeweils halbletale Konzentrationen bestimmt werden. Die Reihenfolge der ermittelten LC_{50} -Werte lautet SDS << Diclofenac-Na < Clindamycin-HCl < Timolol-HM. Das Standardirritans SDS ist die Substanz mit dem stärksten und Timolol-HM mit dem schwächsten zytotoxischen Potential in dieser Arbeit.

Die einzelnen Zelllinien unterschieden sich nicht in ihrem Ansprechen auf die jeweilige Substanz, und es konnte kein Unterschied zwischen immortalisierten und nativen Zellen gefunden werden. Diese Übereinstimmung der Zytotoxizitätsergebnisse bei primären und permanenten Kulturen wurde bereits von Gueniche und Ponec (1993) bei humanen Hautzellen beobachtet.

Bei der Durchführung der Zytotoxizitätsuntersuchungen gibt es viele Variationsmöglichkeiten. Neben der Inkubationsdauer, die einen Einfluss auf die Schädigung der Zellen hat [Jelinek, 2001], ist das Lösungsmittel, mit dem die schädigende Substanz auf die Zellen aufgebracht wird, ein weiterer wichtiger Aspekt. Die Versuche in dieser Arbeit wurden mit serumfreiem Phosphatpuffer (PBS) durchgeführt, da es durch das Serum, welches in den Kultivierungsmedien enthalten

ist, zu Veränderungen in den ermittelten halbletalen Konzentrationen kam. Das Serum kann als proteinhaltiges Stoffgemisch mit den toxischen Substanzen interagieren und diese durch Bindung inaktivieren. Für SDS existiert ein direkter Zusammenhang zwischen Serumkonzentration und dem Anstieg der halbletalen Dosis [Benoit et al., 1987]. Da die Zusammensetzung von Seren zum einen nicht voll definiert ist und zum anderen individuellen Schwankungen unterworfen ist, kann es zu unterschiedlich ausgeprägten Wechselwirkungen zwischen den toxischen Agentien und dem Medium kommen, wodurch ein standardisiertes Arbeiten unmöglich ist.

Ein weiterer Grund für die Auswahl des Phosphatpuffers als Lösungsmittel für die eingesetzten Substanzen ist der physiologische pH-Wert von 7,4. Augentropfen, deren pH-Werte aus Stabilitätsgründen außerhalb des euhydrischen Bereiches von pH 7-9 liegen, führen oftmals zu Reizerscheinungen am Auge [Trolle-Lassen, 1958]. Bei den Zellmonolayern kam es außerhalb dieses Bereiches zu einer deutlichen Abnahme der Zellvitalität. Die Epithelzellen waren dabei unempfindlich gegenüber niedrigen pH-Werten, während die cornealen Fibroblasten schon sehr empfindlich auf kleinere Abweichungen vom physiologischen pH-Wert reagierten. Als oberste Zellschicht sind die Epithelzellen nur vom Tränenfilm bedeckt und bilden die Barriere zwischen der Umwelt und dem Auge. Aus diesem Grund müssen sie widerstandsfähiger sein als die Fibroblasten, die unterhalb dieser Barriere in einer stromalen Matrix eingebettet sind.

Die dritte Methode zur Bestimmung der Zellvitalität in dieser Arbeit war die Bestimmung der Membranintegrität mittels Neutralrot-Test. Beim Vergleich der Daten von MTT- und Neutralrot-Test ist zu beachten, dass beide Tests die Anzahl der lebenden Zellen in der Population bestimmen, jedoch mit verschiedenen Mechanismen. Trotzdem wird häufig von Übereinstimmungen zwischen den Untersuchungen berichtet [Borenfreund et al., 1988; Cornelis et al., 1992]. Die Bestimmung der LC_{50} -Werte für SDS mittels Neutralrot-Test führte bei allen drei eingesetzten Zelllinien zu identischen Werten im Vergleich zum MTT-Test.

Die Untersuchungen an den Zellmonolayern sollten der Evaluierung der Testdurchführung an den Cornea-Konstrukten dienen. Des Weiteren sollten sie als Referenzdaten für die untersuchten Substanzen im Vergleich zu den Cornea-Konstrukten fungieren.

5.5 Vergleichende Zytotoxizitätsuntersuchungen an den beiden Cornea-Konstrukt-Typen

Zytotoxizitätstests an Monolayerkulturen werden häufig als Alternativmethoden für Tierversuche zur Bestimmung okularer und dermalen Reizwirkung eingesetzt [Ekwall, 1983]. Diese einzelnen Zellmonolayer zeigen jedoch häufig eine höhere Empfindlichkeit gegenüber zytotoxischen Substanzen als die Gewebe in vivo [Gay et al., 1992; Schneider, 1996]. Die Verwendung von dreidimensionalen Gewebe-äquivalenten bietet den Vorteil die verschiedenen Zellarten in einem gewebe-ähnlichen Verbund als Gesamtheit zu betrachten und nicht als isolierte Monolayer. Durch Ausbildung von mehrschichtigen Epithelien kommt es zu einer Diffusionsbarriere, die die Passage der toxischen Substanzen in die tiefer liegenden Bereiche verlangsamt und so die dort lokalisierten Zellen schützt. Daher war die Epithelschicht auch diejenige, die als erste morphologische Veränderungen beim Einwirken zytotoxischer Substanzen zeigte. Die Anzahl der intakten Zellkerne war bei beiden Epithelzelllinien bereits bei der halbletalen Konzentration vermindert und mit steigender Konzentration kam es zu einem immer stärker werdenden Aufquellen und -lockern der epithelialen Gewebeschicht bis zum kompletten Auflösen der Gewebestrukturen. Die morphologischen Veränderungen am Epithel der Konstrukte zeigten, dass eine Schädigung auch immer mit einem Verlust der Barrierefunktion einhergeht. Bei Permeationsuntersuchungen mit benzalkoniumchloridhaltigen Arzneistofflösungen wurden immer höhere Permeationsraten als mit konservierungsmittelfreien Zubereitungen gefunden [Goskonda et al., 2000; Burgalassi et al., 2001; Reichl, 2003]. Benzalkoniumchlorid hat ein hohes zytotoxisches Potential und wirkt sich daher negativ auf die Barrierefunktion des Epithels aus, wodurch die Enhancerwirkung erklärt wird.

Die Zytotoxizitätsuntersuchungen an den Cornea-Konstrukten mit CEPI- und HCE-T-Epithel zeigten, dass die Konstrukte gegenüber SDS um den Faktor 9,5 unempfindlicher waren, als die Monolayerkulturen. Bei den untersuchten Arzneistoffen wurden, mit Ausnahme von Diclofenac-Na, ebenfalls geringere Empfindlichkeiten der Cornea-Konstrukte gegenüber den Monolayer-Kulturen gefunden. Die Unterschiede waren allerdings nicht so drastisch wie beim SDS. Die Reihenfolge der LC_{50} -Werte blieb mit $SDS \ll \text{Diclofenac-Na} < \text{Clindamycin-HCl} < \text{Timolol-HM}$ dieselbe wie bei den Monolayeruntersuchungen. Bei den hier durchgeführten Zytotoxizitätsuntersuchungen am humanen Cornea-Konstrukt wurde

deutlich, dass es keinen allgemeingültigen Faktor zwischen den am Gewebe-äquivalent und am Zellmonolayer ermittelten halbletalen Konzentrationen gibt, jedoch die Reihenfolge der zytotoxischen Potentiale gleich bleibt.

Betrachtet man die Veränderung der LC_{50} -Werte über die einzelnen Kultivierungsstadien, sieht man, dass die Abnahme der Empfindlichkeit der Cornea-Konstrukte gegenüber SDS und Clindamycin-HCl schrittweise erfolgte, während es beim Diclofenac-Na zu keiner Änderung der LC_{50} kam.

Im ersten Kultivierungsstadium besteht das Cornea-Konstrukt lediglich aus einem Endothelmonolayer auf einem kollagenhaltigen Bodengel. Die ermittelten halbletalen Konzentrationen von SDS, Clindamycin-HCl und Diclofenac-Na lagen erwartungsgemäß im Bereich der LC_{50} -Werte der Monolayeruntersuchungen.

Auf den Endothelmonolayer wurde im zweiten Kultivierungsschritt das Stroma in Form eines Kollagengels mit inkorporierten Fibroblasten aufgebracht, welches im weiteren Kultivierungsverlauf eine Kontraktion aufgrund der vitalen Fibroblasten zeigte. Dieses Stroma erhöhte die Widerstandsfähigkeit der Cornea-Konstrukte drastisch. Ob die deutliche Veränderung von der erhöhten Zellzahl oder von der Kollagenmatrix ausging, sollten Untersuchungen mit azellulären Kollagengelen auf dem Endothelmonolayer zeigen. Sowohl die fibroblastenhaltigen als auch die azellulären Kollagengele zeigten eine Abschirmung des Endothels. Dabei war der schützende Effekt bei niedrigen SDS-Konzentrationen beim azellulären Gel sogar etwas höher. Durch die fehlende Kontraktion behielt das Gel die Größe des Transwell-Einsatzes, und das toxische Agens erreichte die Endothelzellen schlechter. Zusätzlich wurde das SDS an Proteine gebunden, die im Kollagengel enthalten sind, was die niedrigere zytotoxische Wirkung von SDS bei Anwesenheit von Serum in den Monolayeruntersuchungen bereits zeigte. Die Kollagenmatrix hat also einen großen Einfluss auf die zunehmende Widerstandsfähigkeit der Konstrukte, zum einen als mechanische Barriere und zum anderen durch Bindung des SDS an Proteine.

Im dritten Kultivierungsstadium befindet sich ein Epithelzellmonolayer auf der stromalen Matrix. Dabei kam es zu Unterschieden in der Empfindlichkeit gegenüber SDS und Clindamycin-HCl, je nachdem welche Epithelzelllinie eingesetzt wurde. Die unterschiedliche Widerstandsfähigkeit der Konstrukte mit CEPI- und HCE-T-Epithel in Bezug auf die schädigende Wirkung von SDS und Clindamycin-HCl könnte durch Unterschiede in der wechselseitigen Kommunikation der verschiedenen Zellarten in

Gegenwart der verschiedenen Wirkstoffe hervorgerufen werden. Gerade die stromal-epithelialen Wechselwirkungen werden immer wieder in der Literatur beschrieben [Zieske et al., 1994; Tegtmeier, 2000]. Die Kokultivierung der cornealen Fibroblasten mit den beiden Epithelzelllinien CEPI und HCE-T sollte eine mögliche Beeinflussung der Zelllinien aufzeigen. Diese war nur bei der HCE-T-Zelllinie zu beobachten, die mit einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber hohen SDS-Konzentrationen in Gegenwart cornealer Fibroblasten reagierte, so dass man von einer Beeinflussung der Epithelzelllinie HCE-T durch die Fibroblasten ausgehen konnte. Das erklärt das plötzliche Absinken der LC_{50} -Werte beim Cornea-Konstrukt von 118 $\mu\text{g/ml}$ auf 84 $\mu\text{g/ml}$ für SDS, wenn ein Epithel aus HCE-T-Zellen auf die stromale Matrix aufgebracht wird. Trotz der nicht vorhandenen Beeinflussung der CEPI-Zellen und den für die Widerstandsfähigkeit eher negativen Einfluss der Fibroblasten auf die HCE-T-Zellen sollte bei der Kultivierung der Konstrukte nicht auf die cornealen Fibroblasten verzichtet werden. In Permeationsuntersuchungen zeigten sie einen positiven Einfluss auf die Barriereigenschaften des Epithels bzw. führten sogar erst zur Bildung eines mehrschichtigen Epithels [Tegtmeier, 2000; Reichl, 2003], das die tiefer liegenden Zellen vor toxischen Substanzen schützt.

Neben der Kokultivierung der Zellen gab es in diesem Kultivierungsstadium auch noch den Einfluss der unterschiedlichen Kultivierungsmedien zu beachten. Wurden die Cornea-Konstrukte mit HCE-T-Epithel im Wachstumsmedium der CEPI-Zellen kultiviert, nahmen die Kontraktion der Gele und ihre Festigkeit zu, wodurch auch die Permeationsbarriere beeinflusst wurde. Die Widerstandsfähigkeit der Cornea-Konstrukte mit HCE-T-Epithel gegenüber SDS wurde durch den Austausch des Kultivierungsmediums allerdings nicht verbessert.

Der letzte Kultivierungsschritt war die Bildung eines mehrschichtigen Epithels durch Anheben der Konstrukte an die Luft-Medium-Grenze. Es kam zu einer gleich bleibenden bzw. etwas höheren Widerstandsfähigkeit der Konstrukte gegenüber den zytotoxischen Substanzen. Das mehrschichtige Epithel konnte durch seine dichtere Barriere die tiefer liegenden Zellen besser vor den einwirkenden Substanzen schützen als der Epithelmonolayer. Die höhere Widerstandsfähigkeit der Cornea-Konstrukte beruht auf dem komplexen Zusammenspiel mehrerer Faktoren, wie es im Originalgewebe auch der Fall ist. Für die halbletale Konzentration von SDS konnte mit den 176 $\mu\text{g/ml}$ in den Untersuchungen am Cornea-Konstrukt mit CEPI-Epithel

eine deutliche Annäherung an den Wert des Draize-Tests mit 250 µg [Material Safety Data Sheet SDS] erzielt werden.

Die alternative Bestimmung der Zellvitalität über die Membranintegrität mit dem Neutralrot-Test erwies sich an den Konstrukten als nicht durchführbar, da der Farbstoff mit dem Kollagen eine Wechselwirkung einging und kein Zusammenhang mehr zwischen Zellvitalität und Farbintensität bestand.

Die in dieser Arbeit vorgestellten humanen Cornea-Konstrukte mit den Epithelzelllinien CEPI und HCE-T sind sehr gut für Permeations- und Zytotoxizitätsuntersuchungen geeignet. Sie haben den Vorteil, dass sie sowohl organ- als auch speziesspezifisch sind und somit die größtmögliche Ähnlichkeit zum Zielorgan - der humanen Cornea - besitzen.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das bestehende organotypische humane Cornea-Konstrukt, aufgebaut aus der cornealen Endothelzelllinie HENC, nativen cornealen Fibroblasten in einer Kollagenmatrix und der Epithelzelllinie CEPI, mit einer alternativen Epithelzelllinie HCE-T zu modifizieren und die beiden Cornea-Konstrukt-Typen hinsichtlich Morphologie, Permeationsbarriere und Verhalten gegenüber zytotoxischen Substanzen zu vergleichen. Des Weiteren sollten die Barriereigenschaften der Cornea-Konstrukte mit exzidierten humanen Spenderhornhäuten anhand verschiedener Arzneistoffe verglichen werden. Die Durchführung von Zytotoxizitätsuntersuchungen sollte von den Monolayerkulturen auf die Gewebeäquivalente übertragen und die ermittelten Daten miteinander verglichen werden. Der Grundgedanke dieser Arbeit war ein Tierversuchersatzmodell zu entwickeln, das sowohl für Permeations- als auch für Zytotoxizitätsuntersuchungen geeignet ist.

Zu Beginn war es unerlässlich, die unterschiedlichen humanen cornealen Zelltypen insbesondere die neu eingesetzte Epithelzelllinie (HCE-T) hinsichtlich ihrer Morphologie und ihres Wachstumsverhaltens zu charakterisieren. Alle Zelllinien zeigten ein charakteristisches morphologisches Bild und ein sehr gutes Wachstum unter den gewählten Kultivierungsbedingungen. Zwischen den beiden Epithelzelllinien konnten keine Unterschiede in der Morphologie beobachtet werden, und sie zeigten ein ähnlich schnelles Wachstum. Daher wurde die neu in Kultur genommene Epithelzelllinie HCE-T in gleicher Art und Weise in das Cornea-Konstrukt eingebaut wie die Epithelzelllinie CEPI.

Der Vergleich der Querschnitte durch die Epithelzellschichten der beiden Cornea-Konstrukt-Typen mit CEPI- und HCE-T-Epithel zeigte viele histologische Gemeinsamkeiten mit dem Epithel der humanen Cornea in vivo. Beide immortalisierten Epithelzelllinien sind zur Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels in der Lage und lassen daher die Ausprägung einer Permeationsbarriere erwarten.

Für die Bestimmung dieser Barriereigenschaften der beiden Cornea-Konstrukt-Typen wurden Permeationsuntersuchungen mit den drei Arzneistoffen, Timolol-HM, Diclofenac-Na und Clindamycin-HCl, durchgeführt und mit entsprechenden Experimenten durch exzidierte humane Cornea verglichen. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten nahezu identische Permeationseigenschaften. Ein Vergleich der Permeationskoeffizienten für die wässrigen Lösungen ergab Faktoren zwischen 0,9-1 für die drei eingesetzten Arzneistoffe.

Die Cornea-Konstrukte mit HCE-T-Epithel zeigten für Timolol-HM eine deutlich höhere Permeationsbarriere gegenüber den Konstrukten mit CEPI-Epithel und dem humanen Gewebe. Die Permeationsuntersuchungen mit Diclofenac-Na und Clindamycin-HCl ergaben ein vergleichbares Permeationsverhalten durch beide Cornea-Konstrukt-Typen mit CEPI- und HCE-T-Epithel.

Ein Problem bei der Kultivierung der humanen Cornea-Konstrukte mit HCE-T-Epithel war die verminderte Kontraktion und somit eine geringere Festigkeit der Matrix. Ein Austausch des Kultivierungsmediums für die letzten beiden Entwicklungsstufen führte zu einer Verbesserung der mechanischen Stabilität.

Mit Zytotoxizitätsuntersuchungen am Monolayer der humanen cornealen Zellen sollten im Vorfeld das schädigende Potential des Standardirritans SDS und der verwendeten Arzneistoffe sowie einige weitere Versuchsparameter untersucht werden. Anhand morphologischer Veränderungen der Zellen, ihrer mitochondrialen Reduktionskapazität und der Membranintegrität wurden die halbletalen Konzentrationen der Substanzen ermittelt. Die einzelnen Zelllinien unterschieden sich nur gering in ihrer Empfindlichkeit gegenüber der jeweiligen Substanz, unabhängig davon, ob es sich um immortalisierte oder native Zellen handelte. Die Reihenfolge der ermittelten LC_{50} -Werte der eingesetzten Substanzen lautet $SDS \ll \text{Diclofenac-Na} < \text{Clindamycin-HCl} < \text{Timolol-HM}$.

Des Weiteren wurde ein schädigender Einfluss von pH-Werten kleiner 7 und größer 9 sowie eine verminderte zytotoxische Konzentration von SDS durch die Anwesenheit von Serum beobachtet. Mittels MTT- und Neutralrot-Test wurden bei den Monolayeruntersuchungen identische LC_{50} -Werte detektiert.

Die Zytotoxizitätsuntersuchungen an den Cornea-Konstrukten mit CEPI- und HCE-T-Epithel ergaben eine höhere Widerstandsfähigkeit gegenüber SDS, Clindamycin-HCl und Timolol-HM im Vergleich zu den Monolayeruntersuchungen, während gegenüber Diclofenac-Na keine Änderung detektiert werden konnte. Zwar konnte kein allgemeingültiger Faktor zwischen den an Gewebeäquivalent und Zellmonolayer ermittelten halbletalen Konzentrationen ermittelt werden, doch die Reihenfolge der zytotoxischen Potentiale blieb gleich.

Eine Betrachtung der einzelnen Kultivierungsstadien zeigte eine schrittweise Abnahme der Empfindlichkeit der Cornea-Konstrukte gegenüber SDS und Clindamycin-HCl mit zunehmender Kultivierungsdauer. Als Grund hierfür wurde das Zusammenspiel mehrerer Faktoren wie Kokultivierung der Zellarten und Einbettung

in eine kollagenhaltige Matrix ausgemacht.

Der Neutralrot-Test ist im Gegensatz zum MTT-Test nicht für eine Bestimmung der Zytotoxizität am Konstrukt geeignet, da es zu Inkompatibilitäten zwischen Farbstoff und Kollagen kam.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die humanen Cornea-Konstrukte sowohl mit einem Epithel der Zelllinie CEPI als auch mit einem Epithel der Zelllinie HCE-T sehr gut für Permeations- und Zytotoxizitätsuntersuchungen geeignet sind.

7 Literaturverzeichnis

Abraham MH, Kumarsingh R, Cometto-Muniz JE, Cain WS (1998a) Draize Eye Scores and Eye Irritation Thresholds in Man Combined into one Quantitative Structure-Activity Relationship, *Toxicol in Vitro* 12:403-408

Abraham MH, Kumarsingh R, Cometto-Muniz JE, Cain WS (1998b) A Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) for a Draize Eye Irritation Database, *Toxicol in Vitro* 12:201-207

Adachi M, Pollak OJ (1966) Rabbit's corneal cells studied in Tissue cultures I. Morphologic and quantitative aspects. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 70:279-283

Agatonovic-Kustrin S, Evans A, Alany RG (2003) Prediction of corneal permeability using artificial neural networks, *Pharmazie* 58: 725–729

Ahmed I, Gokhale RD, Shah MV, Patton TF (1987) Physicochemical Determinants of Drug Diffusion across the Conjunctiva, Sclera, and Cornea, *J Pharm Sci* 76 (8):583-586

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2004) *Molekularbiologie der Zelle*, Wiley-VCH, Weinheim, 4. Auflage

Allman MI, Harper RA, Yanoff M, Curfman LJ, Cameron JD, Flaxman BA (1976) Rabbit corneal epithelial cells grown in vitro without serum, *Invest Ophthalmol* 15:666 668

Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, Hayashi K, Watanabe H, Tano Y, Handa H (1995) An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:614-621

Asbill C, Kim N, El-Kattan A, Creek K, Wertz P, Michniak B (2000) Evaluation of a human bio-engineered skin equivalent for drug permeation studies. *Pharm Res* 17:1092-1097

Asselineau D, Bernard BA, Bailly C, Darmon M, Prunieras M (1986) Human epidermis reconstructed by culture: Is it "normal"? *Invest Dermatol* 86(2):181-186

Audus KL, Bartel RL, Hidalgo IJ, Borchardt RT (1990) The Use of Cultured Epithelial and endothelial Cells for Drug Transport and Metabolism Studies, *Pharm. Res.* 7 (5):435-451

Audus KL (1996) Buccal Epithelial Cell Cultures as a Model to Study Oral Mucosal Drug Transport and metabolism, aus *Oral Mucosal Drug Delivery* von Rathbone MJ, Informa Health Care

Auerbach R, Grobstein C (1958) Inductive interaction of embryonic tissues after dissociation and reaggregation. *Exp Cell Res* 15:384-397

Balls M, Botham PA, Bruners LH, Spielmann H (1995) The EC/HO International Validation Study on Alternatives to the Draize Eye Irritation Test, *Toxicol In Vitro* 9 (6):871-929

Bantsev V, McCanna D, Banh A, Wong WW, Moran KL, Dixon DG, Trevithick JR, Sivak JG (2003) Mechanisms of Ocular Toxicity Using the in Vitro Bovine Lens and Sodium Dodecyl Sulfate as a chemical Model, *Toxicol Sci* 73:98 107

Bartlett JD, Novack GD, Hiatt JA, Jaanus SD, Sharir M (1995) Antiglaucoma Drugs, In: Bartlett JD, Jaanus SD *Clinical Ocular Pharmacology*, Butterworth-Heinemann

Bauer KH, Frömming KH, Führer C (2006) *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 8. Auflage

- Baydoun L, Ludwig A, Müller-Goymann CC** (2002) Influence of amphiphilic starch on in vitro permeation of diclofenac sodium through porcine cornea and investigation of interaction with mucin. ADRITELF/APGI/APV Proc. 4th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics, Pharmaceutical Technology, 939-940
- Beck T, Langhage P** (1995) Auge und visuelles System, Pharmazeutische Zeitung, 140, 51/52
- Becker B, Podos SM, Asseff CF** (1972) Microsurgery of the outflow channels, clinical research. In: Bellows JG (Hrsg) Contemporary Ophthalmology. St.Louis, Mosby
- Becker U, Ehrhardt C, Daum N, Baldes C, Schaefer UF, Ruprecht KW, Kim, KJ, Lehr, CM** (2007) Expression of ABC-Transporters in Human Corneal Tissue and the Transformed Cell Line, HCE-T, J Ocul Pharmacol Ther 23 (2), 172-181
- Bednarz J, Weich HA, Rodokanaki von Schrenk A, Engelmann K** (1995) Expression of Genes Coding Growth Factor Receptors in Differentiated and Dedifferentiated Human Corneal Endothelial Cells, Cornea 14 (4):372-381
- Bednarz J, Teifel M, Friedl P, Engelmann K** (2000) Immortalization of human corneal endothelial cells using electroporation protocol optimized for human corneal endothelial and human retinal pigment epithelial cells. Acta Ophthalmol Scand 78:130-136
- Bednarz J, Doubilei V, Wollnik PCM, Engelmann K** (2001) Effect of three different media on serum free culture of donor corneas and isolated human corneal endothelial cells. Br J Ophthalmol 85:1416-1420
- Bell E, Ivarsson B, Merrill C** (1979) Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. Proc Natl Acad Sci 76:1274-1278
- Bell E, Sher S, Hull B, Merrill C, Rosen S, Chamson A, Asselineau D, Dubertret D, Coulomb B, Lapiere C, Nusgens B, Neveux Y** (1983), The reconstitution of living skin, Invest. Dermatol 81(1):2-10
- Bell E, Gay R, Swiderek M, Class T, Kemp P, Green G, Haimes H, Bilbo P** (1991) Use of fabricated living tissue and organ equivalents as defined higher order systems for the study of pharmacologic responses to test substances; in Pharmaceutical Applications of Cell and Tissue Culture to Drug Transport, Wilson et al. (eds), Plenum Press, New York, 51-65
- Benoit J, Cormier M, Wepierre J** (1987), Effect of proteins on the assessment of surfactant cytotoxicity by an In Vitro test: Possible Correlations with In Vivo data, Toxicol In Vitro 1 (2):91-96
- Bertelmann E, Knapp S, Rieck P, Keipert S, Hartmann C, Pleyer U** (2003) Transkornealer-parakornealer Penetrationsweg für lokal applizierte Pharmaka am Auge, Ophthalmologie 100:696-701
- Bhatia SK, Yetter AB** (2008) Correlation of visual in vitro cytotoxicity ratings of biomaterials with quantitative in vitro cell viability measurements; Cell Biol Toxicol Jul;24(4):315-319
- Binder RF, Binder HF** (1954), Regenerative processes in the endothelium of the cornea, Arch. Ophthalmol 57, 11-13
- Bleckmann H, Kresse H** (1979) Influence of glycosaminoglycan synthesis of cultured cornea stroma cells by variation of culture condition. Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol 210:291-300

- Böhnke M, Eggli P, Engelmann K** (1999) Transplantation of cultured adult human or porcine corneal endothelial cells onto human recipients in vitro. Part II: Evaluation in the scanning electron microscope. *Cornea* 18:207-213
- Boozchaloo S, Reichl S** (1996) Charakterisierung verschiedener Kollagene durch Gelelektrophorese, Seminararbeit, TU Braunschweig
- Borenfreund E, Puerner JA** (1985) A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90), *Meth Cell Sci* 9 (1), 7-9
- Borenfreund E, Puerner JA** (1985a) Toxicity Determined In Vitro by Morphological Alterations and Neutral Red Absorption, *Toxicol Lett* 24:119 124
- Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N** (1988) Comparisons of two In Vitro Cytotoxicity Assays – The Neutral Red (NR) And Tetrazolium MTT Test, *Toxicol In Vitro* 2(1):1-6
- Bradlaw JA, Wilcox NL** (1997) Workshop on Eye Irritation Testing: Practical Applications of Non-Whole Animal Alternatives, *Food Chem Toxicol* 35:1-11
- Brantom PG, Bruner LH, Chamberlain M, De Silva O, Dupuis J, Earl LK, Lovell DP, Pape WJW, Uttley M** (1997) A summary Report of the COLIPA International Validation Study on Alternatives to the Draize Rabbit Eye Irritation Test, *Toxicol In Vitro* 11:141 179
- Bruner LH, Miller KR, Owicki JC, Parce JW, Muir VC** (1991) Testing Ocular irritancy with the Silicon Microphysiometer, *Toxicol in Vitro* 5 (4):277-284
- Burgalassi S, Chetoni P, Monti D, Saettone MF** (2001) Cytotoxicity of potential ocular permeation enhancers evaluated on rabbit and human corneal epithelial cell lines. *Toxicol Lett* 122:1-8
- Burgalassi S, Monti D, Brignoccoli A, Fabiani O, Lenzi C, Pirone A, Chetoni P** (2004) Development of Cultured Rabbit Corneal Epithelium for Drug Permeation Studies : A Comparison with Excised Rabbit Cornea, *J Ocul Pharmacol Therap* 20 (6):518 532
- Burstein NL, Anderson JA** (1985) Review: Corneal Penetration and Ocular Bioavailability of Drugs, *J Ocul Pharmacol* 1 (3):309 326
- Carrel A** (1912) On the permanent life of tissues outside the organism. *Exp Med* 15:516-528
- Castro-Munozledo F, Valencia-Garcia C, Kuri-Harcuch W** (1997) Cultivation of rabbit corneal epithelial cells in serum-free medium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:2234-2244
- Catroux P, Rougier A, Dossou KG, Cottin M** (1993) The Silicon Microphysiometer for testing Ocular Toxicity In Vitro, *Toxicol In Vitro* 7 (4):465-469
- Chalabi RGE** (1996) Primär- und Subkultur humaner zentraler Corneaepithelzellen. Dissertation, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen
- Chan KY, Haschke RH** (1982) Isolation and culture of corneal cells and their interactions with dissociated trigeminal neurons. *Exp Eye Res* 35:137-156
- Chan KY, Haschke RH** (1983) Epithelial-Stromal Interactions: Specific Stimulation of Cornea1 Epithelial Cell Growth in vitro by a Factor(s) from Cultured Stromal Fibroblasts, *Exp Eye Res* 36:231-246
- Chan T, Payor S, Holden BA** (1983) Corneal Thickness Profiles in Rabbits Using an Ultrasonic Pachometer, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24:1408-1410
- Chang JE, Basu SK, Lee VH** (2000) Air-interface condition promotes the formation of tight corneal epithelial cell layers for drug transport studies. *Pharm Res* 17:670-676

- Chang SC, Bundgaard H, Buur A, Lee VH** (1987) Improved corneal penetration of timolol prodrugs as a means to reduce systemic drug load, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28 (3):487-491
- Combes RD, Gaunt I, Balls M** (2004) A scientific and animal welfare assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the safety testing of chemicals under the European Union REACH system *ATLA* 32:163-208
- Cornelis M, Dupont C, Wepierre J** (1992) Prediction of eye irritancy potential of surfactants by cytotoxicity tests in vitro on cultures of human skin fibroblasts and keratinocytes. *Toxic. In Vitro* 6(2):119-128
- Cox DA** (1995) Transforming Growth Factor-Beta 3; *Cell Biol Int* 19:357-371
- Daniels JT, Khaw PT** (2000), Temporal Stimulation of Corneal Fibroblast Wound Healing Activity by Differentiating Epithelium In Vitro, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41 (12), 3754-3762
- Denk PO, Wunderlich K, Knorr M** (1998) Serumfreie Kultivierung boviner stromaler Fibroblasten, *Ophthalmologie* 95:148 152
- Deshpande G, Schoenwald RD, Barfknecht CF, Duffel MW** (2000) In vitro and ex vivo hydrolysis rates of ethacrynate esters and their relationship to intraocular pressure in the rabbit eye. *J Ocul Pharmacol Ther* 16:539-556
- Di Girolamo N, Chui J, Wakefield D, Coroneo MT** (2007), Cultured human ocular surface epithelium on therapeutic contact lenses, *Br J Ophthalmol* 91:459–464
- Digweed M, Bender O, Demuth I, Gutschmidt G, Rothe S, Saar K** (1997) Gentransfer in der Humangenetik, Praktikumsskript "Molekularbiologische Methoden in der Humangenetik", Institut für Humangenetik, Charité Berlin
- Dolder R, Skinner FS** (1983) *Ophthalmika*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 3. Auflage
- Draize JH, Woodard G, Calvery HO** (1944) Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes, *J Pharmacol Exp Therap* 82:377 390
- Easty DL, Carter CA, Lewkowicz-Moss SJ** (1986) Corneal cell culture and organ storage. *Trans Ophthalmol Soc UK* 105:385-396
- Ebato B, Friend J, Thoft RA** (1987) Comparison of central and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28:1450-1456
- Ebato B, Friend J, Thoft RA** (1988) Comparison of limbal and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29:1533-1537
- Effendy I, Weltfreund S, Patil S, Maibach HI** (1996) Differential irritant skin response to topical retinoic acid and sodium lauryl sulphate: alone and in crossover design, *Br. J. Dermatol.* 134:424-430
- Eggli P, Boulton M, Marshall J** (1989) Growth characteristics of central and peripheral bovine corneal epithelial cells in vitro. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 227:263-270
- Ehrlich HP, Rajaratnam JBM** (1990) Cell Locomotion forces versus cell contraction forces for collagen lattice contraction: An in vitro model of wound contraction, *Tissue and Cell* 22 (4), 407-417
- Ehrlich HP, Gabbiani G, Meda P** (2000) Cell Coupling Modulates the Contraction of Fibroblast-Populated Collagen Lattices, *J Cellular Physiologie* 184, 86–92

- Ekwall B** (1983) Screening of toxic compounds in Mammalian Cell Cultures, in: Williams GM, Dunkel VC, Ray VA (Ed) Cellular Systems For Toxicity Testing, The New York Academy Of Sciences 407:64-77
- Elbert K** (1998) Alveolare Epithelzellkultursysteme als in vitro-Modell für die pulmonale Absorption von Arzneistoffen. Dissertation, Universität des Saarlandes Saarbrücken
- El-Ghalbzouri A, Gibbs S, Lamme E, Van Blitterswijk CA, Ponc M** (2002) Effect of fibroblasts on epidermal regeneration. Br J Dermatol 147:230-243
- Engelmann K, Böhnke M, Friedl P** (1988) Isolation and long-term cultivation of human corneal endothelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 29:1656-1662
- Engelmann K, Friedel P** (1989) Optimization of culture conditions for human corneal endothelial cells. In Vitro Cell Dev Biol 25:1065-1072
- Engelmann K, Friedel P** (1995) Growth of human corneal endothelial cells in a serum-reduced medium. Cornea 14:62-70
- Engelmann K, Bednarz J, Böhnke M** (1999a) Endothelzelltransplantation und Wachstumsverhalten des humanen kornealen Endothels. Ophthalmologie 96:555-562
- Engelmann K, Drexler D, Böhnke M** (1999b) Transplantation of adult human or porcine corneal endothelial cells onto human recipients in vitro. Part I: Cell culturing and transplantation procedure. Cornea 18:199-206
- Engelmann K, Bednarz J, Schäfer HJ, Fiedl P** (2001) Isolation and characterization of a mouse monoclonal antibody against human corneal endothelial cells. Exp Eye Res 73:9-16
- Erturk H, Özçetin H, Avci R** (1991) Diclofenac Sodium for the Prevention of Surgically-induced Miosis, Eur J Implant Ref Surg 3:55 57
- Fechner PU, Teichmann KD** (2000) Medikamentöse Augentherapie, ENKE im Georg Thieme Verlag, 4. Auflage
- Flammer J** (2001) Glaukom, Verlag Hans Huber, 2. Auflage
- Flynn L, Yalkowsky SH, Roseman TJ** (1974) Mass transport phenomena and models: Theoretical aspects. J Pharm Sci 63:479-510
- Forbes B** (2000) Human airway epithelial cell lines for in vitro drug transport and metabolism studies, Pharm Sci & Technol Today 3(1):18 27
- Forbes DJ, Pozos RS, Nelson JD, Lima PH** (1984) Characterization of rat corneal epithelium maintained in tissue culture. Curr Eye Res 3:1471-1479
- Fowle AMC, Ormsby HL** (1955) Growth of cornea in tissue culture. Am J Ophthalmol 39:242-246
- Franke H, Galla H, Beuckmann CT** (2000) Primary cultures of brain microvessel endothelial cells: a valid and flexible model to study drug transport through the blood-brain barrier in vitro. Brain Res Protoc 5:248-256
- Franz TJ** (1975) Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. J Invest Derm 64:190-195
- Freshney RI** (1990) Tierische Zellkulturen – Ein Methoden-Handbuch, Walter de Gruyter
- Freshney RI** (2005) Culture of Animal Cells – A Manual of Basic Technique, Wiley-Liss, 5. Auflage
- Freshney RI, Freshney MG** (1996) Culture of immortalized cells, Wiley-Liss, New York

- Friend J, Kinoshita S, Thoft RA, Eliason JA** (1982) Corneal epithelial cell cultures on stromal carriers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 23:41-49
- Fusenig NE, Breitkreutz D, Dzarlieva RT, Boukamp P, Bohnert A, Tilgen W** (1983) Growth and Differentiation Characteristics of Transformed Keratinocytes from Mouse and Human Skin in Vitro and in Vivo, *Invest Dermatol* 81(S1):168-175
- Garrett Q, Khaw PT, Blalock TD, Schultz GS, Grotendorst GR, Daniels JT** (2004) Involvement of CTGF in TGF- β 1–Stimulation of Myofibroblast Differentiation and Collagen Matrix Contraction in the Presence of Mechanical Stress; *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:1109-1116
- Gautheron P, Dukic M, Alix D, Sina JF** (1992) Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: An in Vitro Assay of Ocular Irritancy, *Fundam Appl Toxicol* 18:442-449
- Gautheron P, Giroux J, Cottin M, Audegond L, Morilla A, Mayordomo-Blanco L, Tortajada A, Haynes G, Vericat JA, Pirovano R, Gillio Tos E, Hagemann C, Vanparys P, Deknudt G, Jacobs G, Prinsen M, Kalweit S, Spielmann H** (1994) Interlaboratory assessment of the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay, *Toxicol in Vitro* 8 (3):381-392
- Gay R, Swiderek M, Nelson D, Ernesti A** (1992) The living skin equivalent as a model in vitro for ranking the toxic potential of dermal irritants. *Toxic in Vitro* 6:303-315
- Geggel HS, Friend J, Thoft RA** (1985) Collagen gel for ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26:901-905
- Germain L, Auger FA, Grandbois E, Guignard R, Giasson M, Boisjoly H, Guerin SL** (1999) Reconstructed human cornea produced in vitro by tissue engineering. *Pathobiology* 67:140-147
- Gerrits PO, Smid L** (1983) A new, less toxic polymerisation system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *J. Microsc.* 132, 81 – 85
- Gettings SD, Dipasquale IC, Bagley DM, Casterton PL, Chudkowski M, Curren RD, Demetrulias JL, Feder PI, Galli CL, Gay R, Glaza SM, Hintze KL, Janus J, Kurtz PJ, Lordo RA, Marenus KD, Moral J, Muscatiello M, Pape WJW, Renskers KJ, Roddy MT, Rozen MG** (1994) The CTFA evaluation of alternatives program: An evaluation of in vitro alternatives to the draize primary eye irritation test. (Phase II) oil/water emulsions, *Food Chem. Toxic.* 32 (10):943-976
- Gettings SD, Lordo RA, Hintze KL, Bagley DM, Casterton PL, Chudkowski M, Curren RD, Demetrulias JL, Dipasquale IC, Earl LK, Feder PI, Galli CL, Glaza SM, Gordon VC, Janus J, Kurtz PJ, Marenus KD, Moral J, Pape WJW, Renskers KJ, Rheins LA, Roddy MT, Rozen MG, Tedeschi JP, Zyracki J** (1996) The CFTA evaluation of alternatives program: An evaluation of in vitro alternatives to the draize primary eye irritation test. (Phase III) surfactant-based formulations, *Food Chem. Toxic.* 34 (1):79-117
- Gettings SD, Lordo RA, Demetrulias JL, Feder PI, Hintze KL** (1996a) Comparison of Low-volume, Draize and In Vitro Eye Irritation Test Data I Hydroalcoholic Formulations, *Food Chem. Toxic.* 34:737-749
- Ghiani AA, Grobe GM** (2005) Charakterisierung von Kollagen aus Rattenschwanzsehnen als Matrix für In-vitro-Zellkultursysteme, Wahlpflichtarbeit, TU Braunschweig

- Gipson IK, Grill SM** (1982) A technique for obtaining sheets of intact rabbit corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 23:269-273
- Göbel W, Grehn F** (1998) Das Winkelblockglaukom, *Ophthalmologe* 95, 191-205
- Goskonda VR, Khan MA, Hutak CM, Reddy IK** (1999) Permeability characteristics of novel mydriatic agents using an in vitro cell culture model that utilizes SIRC rabbit corneal cells. *J Pharm Sci* 88:180-184
- Goskonda VR, Hill RA, Khan MA, Reddy IK** (2000) Permeability of chemical delivery systems across rabbit corneal (SIRC) cell line and isolated corneas: a comparative study. *Pharm Dev Technol* 5:409-416
- Grant RL, Yao C, Gabaldon D, Acosta D** (1992) Evaluation of surfactant cytotoxicity potential by primary cultures of ocular tissues: I. Characterization of rabbit corneal epithelial cells and initial injury and delayed toxicity studies. *Toxicol.* 76:153-176
- Grant WM** (1974) *Toxicology of the Eye*, Charles C. Thomas, Springfield, 2nd edition Vol II:962-967
- Grass GM, Robinson JR** (1988a) Mechanisms of corneal drug penetration. I: In vivo and in vitro kinetics. *J Pharm Sci* 77:3-14
- Grass GM, Robinson JR** (1988b) Mechanisms of corneal drug penetration. II: Ultrastructural analysis of potential pathways for drug movement. *J Pharm Sci* 77:15-23
- Grass GM, Cooper ER, Robinson JR** (1988c) Mechanisms of corneal drug penetration. III: Modeling of molecular transport. *J Pharm Sci* 77:24-26
- Grehn F** (2001) Die Perspektive neuroprotektiver Glaukomtherapie, *Ophthalmologe* 98, 925-928
- Griffith M, Osborne R, Munger R, Xiong X, Doillon CJ, Laycock NL, Hakim M, Song Y, Watsky MA** (1999) Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science* 286:2169-2172
- Gruenert DC, Finkbeiner WE, Widdicombe JH** (1995) Culture and transformation of human airway epithelial cells. *Am J Physiol* 268(3 Pt 1):L347-60
- Gueniche A, Ponec M** (1993) Use of Human Skin Cell Cultures for the Estimation of Potential Skin Irritants; *Toxic. in Vitro* 7(1):15-24
- Hackworth LA, Faraji-Shadan F, Schuschereba ST, Bowman PD** (1990) Serum-free culture of porcine and rabbit corneal epithelial cells. *Curr Eye Res* 9:919-923
- Harrison RG** (1907) Observations on the living developing nerve fiber. *Proc Soc Exp Biol Med* 4:140-143
- He YG, McCulley JP** (1991) Growing human corneal epithelium on collagen shield and subsequent transfer to denuded cornea in vitro. *Curr Eye Res* 10:851-863
- Hidalgo IJ, Li J** (1996) Carrier-mediated transport and efflux mechanism in caco-2 cells. *Adv Drug Deliv Rev* 22:53-66
- Hoffmann C, Mueller-Goymann CC** (2005) Use of artificial skin constructs in permeation studies of clindamycin phosphate, *Pharmazie* 60:350-353
- Hopkins G, Pearson R** (2007) *Ophthalmic Drugs – Diagnostic and Therapeutic Uses*, Elsevier, 5. Auflage
- Huang AJW, Tseng SCG, Kenyont KR** (1989) Paracellular Permeability of Corneal and Conjunctival Epithelia; *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30 (4):684-689

- Huang HS, Schoenwald RD, Lach JL** (1983) Corneal Penetration Behavior of beta-Blocking Agents III: Assessment of Barrier Contributions, *J Pharm Sci* 72 (17):1272-1279
- Jacobsen J, van Deurs B, Pedersen M, Rassing MR** (1995) TR146 cell grown on filters as a model for human buccal epithelium: I. Morphology, growth, barrier properties and permeability. *Int J Pharm* 125:165-184
- Jelinek A** (2001) In-vitro-Toxizität grenzflächenaktiver Substanzen: Wirkung auf Zellmembran, mitochondriale Funktion und Apoptose, Dissertation Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Junqueira LC** (1991) Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, Springer, Berlin, 3. Auflage
- Kahn CR, Young E, Lee IH, Rhim JS** (1993) Human corneal epithelial primary cultures and cell lines with extended life span: in vitro model for ocular studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34:3429-3441
- Kanski JJ, Spitznas M** (1987) Lehrbuch der klinischen Ophthalmologie, Thieme-Verlag, Stuttgart, New York, 1. Auflage
- Kawazu K, Shiono H, Tanioka H, Ota A, Ikuse T, Takashina H, Kawashima Y** (1998) Beta adrenergic antagonist permeation across cultured rabbit corneal epithelial cells grown on permeable supports. *Curr Eye Res* 17:125-131
- Kennah HE, Hignet S, Laux PE, Dorko JD, Barroe CS** (1989) An objective Procedure for quantitating eye irritation based upon changes of corneal thickness, *Fundam Appl Toxicol* 12 (2):258-268
- Kinsey A** (1983) Die Permeabilität der Hornhaut. In: Dolder R, Skinner FS (Hrsg) *Ophthalmika – Pharmakologie, Biopharmazie und Galenik der Augenarzneimittel*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- Knipp GT, Ho NF, Barsuhn CL, Borchardt RT** (1997) Paracellular diffusion in Caco-2 cell monolayers: effect of perturbation on the transport of hydrophilic compounds that vary in charge and size. *J Pharm Sci* 86:1105-1110
- Köhler G, Milstein C** (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:496-497
- Koizumi N, Cooper LJ, Fullwood NJ, Nakamura T, Inoki K, Tsuzuki M, Kinoshita S** (2002) An evaluation of cultivated corneal limbal epithelial cells, using cell-suspension culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:2114-2121
- Kristen U** (1997) Use of Higher Plants as Screens for Toxicity Assessment, *Toxicol In Vitro* 11:181-191
- Kristen U, Jung K, Pape W, Pfannenbecker U, Rensch A, Schell R** (1999) Performance of the Pollen Tube Growth Test in the COLIPA Validation Study on Alternatives to the Rabbit Eye Irritation Test, *Toxicol In Vitro* 13:335-342
- Kruszewski FH, Walker TL, DiPasquale LC** (1997) Evaluation of a human corneal epithelial cell line as an in vitro model for assessing ocular irritation. *Fundam Appl Toxicol* 36:130-140
- Kühnel W, Mendoza AS** (1987) Morphologie der Cornea. *Fortschr Ophthalmol* 84:217-224
- Kunsch K, Kunsch S** (2005) *Der Mensch in Zahlen*, Area Verlag, Erfstadt
- Lakhanpal V, Schocket SS, Nirankari VS** (1983) Clindamycin in the treatment of toxoplasmic retinochoroiditis, *Am J Ophthalmol* 95:605-613

- Lee, VHL, Robinson, JR** (1979) Mechanistic and quantitative evaluation of precorneal pilocarpine disposition in albino rabbits, *J. Pharm. Sci.* 68, 673-84
- Lee, VHL., Hui HW, Robinson, JR** (1980) Corneal metabolism of pilocarpine in pigmented rabbits, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 19, 210-213
- Lee VHL, Morimoto KW, Stratford RE** (1982) Esterase Distribution in the Rabbit Cornea and its Implications in Ocular Drug Bioavailability, *Biopharm Drug Dispos* 3:291–300
- Lee VHL, Robinson JR** (1986) Topical ocular drug delivery: recent developments and future challenges. *J Ocular Pharmacol* 2:67-108
- Lehr CM** (2002) Cell culture models of biological barriers. Taylor & Francis, London, New York
- Leighton J, Nassauer J, Tchao R** (1985) The chick embryo in toxicology: an alternative to the rabbit eye, *Food Chem Toxicol* 23:293-298
- Lewis RW, McCall JC, Botham PA** (1994) Use of an In Vitro Test Battery as a Prescreen in the Assessment of Ocular Irritancy, *Toxicol In Vitro* 8 (1):75-79
- Leydhecker W** (1990) Augenheilkunde, Springer Verlag, Berlin, 24. Auflage
- Liaw J, Rojanasakul Y, Robinson JR** (1992) The effect of drug charge type and charge density on corneal transport, *Int J Pharm* 88 111-124
- Liu HK, Chiou GCY, Garg LC** (1980) Ocular hypotensive effects of timolol in cats eyes, *Arch. Ophthalmol.* 98, 1467-1469
- Luepke NP** (1985) Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential, *Food Chem Toxicol* 23:287-291
- Majumdar S, Tirucheraï GS, Pal D, Mitra AK** (2003) Functional Differences in Nucleoside and Nucleobase Transporters Expressed on the Rabbit Corneal Epithelial Cell Line (SIRC) and Isolated Rabbit Cornea, *AAPS PharmSci* 5 (2) Article 15
- Mannagh J, Irvine AR** (1965) Human corneal endothelium: growth in tissue cultures. *Arch Ophthalmol* 74:847-849
- Material Safety Data Sheet**, Sodium Dodecyl Sulfate, Genomic Solutions Inc. (US-Ann Arbor), (2001)
- Matsui J** (1929) Über die in vitro Kultur des Endothels der Membrana Descemetii. *Arch f Exp Zellforschung* 8:553
- Maurice DM, Mishima S** (1984) Ocular Pharmacokinetics. In: Sears ML (Hrsg) *Pharmacology of the eye*, Springer-Verlag, Berlin
- Meller D, Kruse F** (2001) Ex-vivo-Expansion kornealer Stammzellen. *Ophthalmolge* 98:811-817
- Minami Y, Sugihara H, Oono S** (1993) Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34:2316-2324
- Mishima, H, Hibino, T, Hara, H, Murakami, J, Otori, T** (1998) SPARC from Corneal Epithelial Cells Modulates Collagen Contraction by Keratocytes, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39 (13), 2547-2553
- Mitra AK, Mikkelsen TJ** (1988) Mechanism of transcorneal permeation of pilocarpine. *J Pharm Sci* 77:771-775
- Mosman T** (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods* 65:55-63

- Nagano F** (1914) Untersuchungen zur Pathologie des Hornhautendothels, Arch. f. Augenheilkunde 76:26
- Nerurkar MM, Burton PS, Borchardt RT** (1996) The use of surfactants to enhance the permeability of peptides through Caco-2 cells by inhibition of an apically polarized efflux system. Pharm Res 13:528-534
- Niederkorn JY, Meyer DR, Ubelaker JE, Martin JH** (1990) Ultrastructural and immunohistological characterization of the sirc corneal cell line, In Vitro Cell Develop Biol - Plant 26 (9)
- Niggemeier S** (2005) Verlaufsbeobachtung morphologischer und funktioneller Parameter bei verschiedenen Glaukomformen, Dissertation TH Aachen
- OECD** (2002a). Test Guideline 404. Acute Dermal Irritation/Corrosion
- OECD** (2002b). Test Guideline 405. Acute Eye Irritation/Corrosion
- Offord EA, Sharif NA, Mace K, Tromvoukis Y, Spillare EA, Avanti O, Howe WE, Pfeifer AM** (1999) Immortalized human corneal epithelial cells for ocular toxicity and inflammation studies. Invest Ophthalmol Vis Sci 40:1091-1101
- Oh J** (1963) Changes with age in the corneal endothelium of normal rabbits. Acta Ophthalmologica 41:568
- Ohji M, SundarRaj N, Hassell JR, Thoft RA** (1994) Basement membrane synthesis by human corneal epithelial cells in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci 35:479-485
- Ohno Y, Kaneko T, Inoue T, Morikawa Y, Yoshida T, Fujii A, Masuda M, Ohno T, Hayashi M, Momma J, Uchiyama T, Chiba K, Ikeda N, Imanishi Y, Itakagaki H, Kakishima H, Kasai Y, Kurishita A, Kojima H, Matsukawa K, Nakamura T, Ohkoshi K, Okumura H, Saijo K, Sakamoto K, Suzuki T, Takano K, Tatsumi H, Tani N, Usami M, Watanabe R** (1999) Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (1) Overview of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests; Toxicol In Vitro 13 (1):73-98
- Osborne R, Perkins MM, Roberts DA** (1995) Development and intralaboratory evaluation of an in vitro human cell-based test to aid ocular irritancy assessments, Fundam Appl Toxicol 28:139-153
- Pancholi S, Tullo A, Khaliq A, Foreman D, Boulton M** (1998) The effects of growth factors and conditioned media on the proliferation of human corneal epithelial cells and keratocytes. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 236:1-8
- Pape WJW, Pfannenbecker U, Hoppe U** (1987) Validation of the red blood cell test system as an in vitro assay for the rapid screening of irritation potential of surfactants, Mol Toxicol 1:525-536
- Parenteau N** (1994) Skin equivalents. In: Leigh I, Watt F (Hrsg) Keratinocyte methods, Cambridge University Press
- Parnigotto PP, Bassani V, Montesi F, Conconi MT** (1998) Bovine corneal stroma and epithelium reconstructed in vitro: characterisation and response to surfactants. Eye 12:304-310
- Pistov MY, Sadovnikova EY, Danilov SM** (1988) Human corneal endothelial cells: Isolation, characterization and long-term cultivation. Exp Eye Res 47:403-414

- Pleyer U, Torun N, Liesenfeld O** (2007) Okuläre Toxoplasmose, *Ophthalmologie* 104:603-616
- Prausnitz MR, Noonan JS** (1998) Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: a literature analysis for drug delivery to the eye. *J Pharm Sci* 87:1479-1488
- Prinsen MK, Koeter HBWM** (1993) Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the draize eye irritation test with rabbits, *Food Chem Toxicol* 31 (1):69-76
- Prunieras M, Régnier M, Woodley D** (1983) Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J Invest Dermatol* 81(1 Suppl):28s-33s
- Quigley HA** (1987) Reappraisal of the mechanisms of glaucomatous optic nerve damage. *Eye* 1:318-322
- Radda TM, Menzel EJ** (1983) Kollagentypen in menschlicher Kornea und Sklera. *Fortsch Ophthalmol* 79:460-462
- Redbrake C, Becker J, Salla S, Stollenwerk R, Reim M** (1994) The Influence of the Cause of Death and Age on Human Corneal Metabolism, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35(9):3553-3556
- Reichl S** (2003) Entwicklung porciner und humaner organotypischer cornealer Zellkulturmodelle für in vitro Permeationsuntersuchungen, Dissertation, TU Braunschweig
- Reichl S, Müller-Goymann CC** (2001) Entwicklung eines organotypischen Cornea-Konstruktes als ein In-Vitro-Modell für Permeationsstudien, *Ophthalmologie* 98:853-858
- Reichl S, Müller-Goymann CC** (2003) The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride, *Int J Pharm* 250:191-201
- Reichl S, Bednarz J, Müller-Goymann CC** (2004) Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies, *Br J Ophthalmol* 88:560–565
- Reichl S, Döhring S, Bednarz J, Müller-Goymann CC** (2005) Human cornea construct HCC - an alternative for in vitro permeation studies? A comparison with human donor corneas; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 60:305–308
- Rojanasakul Y, Wang LY, Bhat M, Glover DD, Malanga CJ, Ma JKH** (1992) The Transport Barrier of Epithelia: A Comparative Study on Membrane Permeability and Charge Selectivity in the Rabbit, *Pharm Res* 9 (8):1029-1034
- Romeis B** (1989) *Mikroskopische Technik*, Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore
- Rubin LL, Hall DE, Porter S, Barbu K, Cannon C, Homer HC, Janatpour M, Liaw CW, Manning K, Morales J, Tanner L, Tbmaseilli KJ, Bard F** (1991) A Cell Culture Model of the Blood-Brain Barrier, *J Cell Biol* 115(6):1725 1735
- Russell WMS, Burch RL** (1959) *The principles of humane experimental technique*, London : Methuen
- Saarinen-Savolainen P, Järvinen T, Araki-Sasaki K, Watanabe H, Urtti A** (1998) Evaluation of Cytotoxicity of Various Ophthalmic Drugs, Eye Drop Excipients and Cyclodextrins in an Immortalized Human Corneal Epithelial Cell Line, *Pharmaceut Res* 15 (8):1275 1280

- Savla U, Waters CM** (1998) Mechanical strain inhibits repair of airway epithelium in vitro, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 274:883-892
- Scaife MC** (1985) An In Vitro Cytotoxicity Test To Predict The Ocular Irritation Potential Of Detergents and Detergent Products, *Food Chem Toxic* 23 (2):253-258
- Schepers U** (2006) Statistische Beurteilung der Güte von analytischen Ergebnissen - Untersuchungen zur Präzision in der HPLC und Bewertung analytischer Methodentransfers, Dissertation Technische Universität Braunschweig
- Schermer A, Galvin S, Sun TT** (1986) Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 103:49-62
- Schleger C, Krebsfaenger N, Kalkuhl A, Bader R, Singer T** (2001) Möglichkeit der Nutzung von Zellkulturmethoden in der Arzneimittelentwicklung, *ALTEX* 18:5-8
- Schmitz S** (2007) Der Experimentator Zellkultur, Spektrum Akademischer Verlag 1. Auflage
- Schneider A** (1996) Entwicklungen zu einem In-vitro.Cornea-Modell im Hinblick auf eine Alternative zum Draize-Test, Dissertation Universität Hohenheim
- Schneider A, Maier-Reif K, Graeve T** (1997) The use of an in vitro cornea for predicting ocular toxicity. *In vitro toxicol* 10:309-318
- Scholz M, Schrunder S, Gartner S, Keipert S, Hartmann C, Pleyer U** (2002) Ocular drug permeation following experimental excimer laser treatment on the isolated pig eye. *J Ocul Pharmacol Ther* 18:177-183
- Schwarz LR** (1996) Cytotoxizität. In: *Toxikologie* (Hrsg.: Greim/Demel), Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, S. 117-134
- Sharif NA, Wiernas TK, Howe WE, Griffin BW, Offord EA, Pfeifer AM** (1998) Human corneal epithelial cell functional responses to inflammatory agents and their antagonists. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:2562-2571
- Sharpe R** (1985) The Draize Test - Motivations for Change, *Fd Chem Toxic* 23:139-143
- Sina JF, Ward GJ, Laszek MA, Gautheron PD** (1992) Assessment of Cytotoxicity Assays as Predictors of Ocular Irritation of Pharmaceuticals. *Fund. Appl. Toxicol.* 18:515-521
- Slick WC, Mannagh J, Yuhasz Z** (1965) Enzymatic removal and pure culture of rabbit corneal endothelial cells. *Arch Ophthalmol* 73:229-232
- Smith AU, Ashwood-Smith MJ, Young MR** (1963) Some in vitro studies on rabbit corneal tissue. *Exp Eye Res* 2:71-87
- Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SC** (2001) Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol* 85:444-449
- Sonntag JR, Brindley GO, Shields MB** (1978) Effect of timolol therapy on outflow facility, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17, 293-296
- Specht C, Stoye I, Müller-Goymann CC** (1998) Comparative investigations to evaluate the use of organotypic cultures of transformed and native dermal and epidermal cells for permeation studies, *Eur J Pharm Biopharm* 46:273-278
- Speckmann EJ, Wittkowski W** (2004) *Bau und Funktion des menschlichen Körpers*, Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 20. Auflage

- Spielmann H** (1997) Ocular Irritation, aus In Vitro Methods in Pharmaceutical Research, Castell JV, Gomez-Lechon MJ (eds), Academic Press
- Spielmann H, Gerner I, Kalweit S, Moog R, Wirnsberger T, Krauser K, Kreiling R, Kreuzer H, Lüpke NP, Miltenburger HG, Müller N, Mürmann P, Pape W, Siegemund B, Spengler J, Steiling W, Wiebel FJ** (1991) Interlaboratory assessment of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany, Toxicol In Vitro 5:539-542
- Stanness KA, Westrum LE, Fornaciari E, Mascagni P, Nelson JA, Stenglein SG, Myers T, Janigro D** (1997) Morphological and functional characterization of an in vitro blood–brain barrier model, Brain Research 771:329-342
- Stocker FW, Eiring A, Georgiade R, Georgiade N** (1958) A tissue culture technique for growing corneal epithelial, stromal, and endothelial tissues separately. Am J Ophthalmol 46:294-298
- Suda T, Nishida T, Ohashi Y, Nakagawa S, Manabe R** (1981) Fibronectin appears at the site of corneal stromal wound in rabbits. Curr Eye Res 1:553-556
- Svedberg B, Bill A** (1972) Scanning electron microscopic studies of the corneal endothelium in man and monkeys. Acta Ophthalmol 50:321-336
- Tak RV, Pal D, Gao H, Dey S, Mitra AK** (2001) Transport of Acyclovir Ester Prodrugs Through Rabbit Cornea and SIRC-Rabbit Corneal Epithelial Cell Line, J Pharm Sci, Vol 90 (10):1505-1515
- Takahashi I, Sashima S, Nakazawa K** (2001) Comparative analysis of proteoglycans synthesized by chick corneal stromal cells in cell culture and organ culture. Biol Pharm Bull 24:27-33
- Taylor-Papadimitriou J, Purkis P, Fentiman IS** (1980) Cholera Toxin and Analogues of Cyclic AMP Stimulate the Growth of Cultured Human Mammary Epithelial Cells, J Cell Physiol 102:317-322
- Tchao R** (1988) Trans-epithelial permeability of fluorescein in vitro as an assay to determine eye irritants, In Goldberg AM (Hrsg.) Alternative Methods in toxicology Vol 6, Progress in In Vitro Toxicology, 271-283
- Tegtmeyer S** (2000) Kultivierung und Charakterisierung von bovinen in vitro Cornea-Modellen für Permeationsuntersuchungen. Dissertation, TU-Braunschweig
- Tegtmeyer S, Papantoniou I, Müller-Goymann CC** (2001) Reconstruction of an in vitro cornea and its use for drug permeation studies from different formulations containing pilocarpine hydrochloride. Eur J Pharm Biopharm 51:119-125
- Tegtmeyer S, Reichl S, Müller-Goymann CC** (2004) Cultivation and characterization of a bovine in vitro model of the cornea; Pharmazie 59:464-471
- Thews G, Mutschler E, Vaupel P** (1999) Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 5. Auflage
- Thygeson P** (1939) Cultivation in vitro of human conjunctival and corneal epithelium. Am J Ophthalmol 22:649-654
- Tierschutzbericht der Bundesregierung** 2007 – Kabinettdvorange, Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Mai 2007

- Toropainen E, Ranta VP, Talvitie A, Suhonen P, Urtti A** (2001) Culture model of human corneal epithelium for prediction of ocular drug absorption. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:2942-2948
- Tripathi RC, Parapuram SK, Tripathi BJ, Zhong Y, Chalam KV** (1999) Corticosteroids and Glaucoma Risk, *Drugs & Aging* 15 (6), 439-450
- Trolle-Lassen C** (1958) Investigations into the sensitivity of the human eye to hypo- and hypertonic solutions as well as solutions with unphysiological hydrogen ion concentrations; *Pharm Weekbl.* 1958 Feb 22;93(4):148-55.
- Tseng SC, Kruse FE, Merritt J, Li DQ** (1996) Comparison between serum-free and fibroblast-cocultured single-cell clonal culture systems: evidence showing that epithelial anti-apoptotic activity is present in 3T3 fibroblast-conditioned media. *Curr Eye Res* 15:973-984
- Vale J, Phillips CI** (1970) Effect of DL- and D-propranolol on ocular tension in rabbits and patients, *Exp Eye Res.* 9, 82-90
- Von der Eltz C** (2000) Drucksenkung und Verbesserung der okulären Durchblutung. *Pharm Ztg* 145:1646-1648
- von Sallmann L, Caravaggio LL, Grimes P** (1961) Studies on the corneal endothelium of the rabbit. I. Cell division and growth. *Am J Ophthalmol* 51 (pt.2):955
- Weitz B** (1998) Atlas der Anatomie – Organsysteme und Strukturen in 439 Abbildungen, Weltbild Verlag
- Wensor MD, McCarty CA, Stanislavsky YL, Livingston PM, Taylor HR** (1998) The prevalence of glaucoma in the Melbourne Visual Impairment Project. *Ophthalmology* 105:733-739
- Werner A, Braun M, Reichl S, Kietzmann M** (2008) Establishing and functional testing of a canine corneal construct, *Vet Ophthalmol* 11(5):280-289
- Wilkins LM, Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF, Parenteau NL** (1994) Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications, *Biotechnology and Bioengineering* 43:747-756
- Wilson SE, Hong JW** (2000) Bowman's Layer Structure and Function, *Cornea* 19 (4), 417-420
- Yue BY, Baum JL, Silbert JE** (1978) Synthesis of glycosaminoglycans by cultures of normal human corneal endothelial and stromal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17:523-527
- Yue BY, Baum JL, Smith BD** (1983) Identification of collagens synthesized by cultures of normal human corneal and keratoconus stromal cells. *Biochim Biophys Acta* 755:318-325
- Zieske JD, Mason VS, Wasson ME, Meunier SF, Nolte CJ, Fukai N, Olsen BR, Parenteau NL** (1994) Basement membrane assembly and differentiation of cultured corneal cells: importance of culture environment and endothelial cell interaction. *Exp Cell Res* 214:621-633